UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1966 — N° 521

CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS TÉNIFUGES DES COURGES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "Pharmacie"

présentée et soutenue publiquement le jeudi 2 juin 1966

PAR

Mme Françoise SEGUIN-BARBESSOU

PHARMACIENNE

née à Bordeaux-Caudéran (Gironde), le 14 juillet 1938

Examinateurs de la thèse :

MM. J. BAILENGER, professeur ..... *Président*

R. CASTAGNOU, professeur ..... *Juges*

R. PAUTRIZEL, professeur ..... *Juges*

Mlle S. LARCEBAU, maître de conférences agrégé . *Juges*

1966

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1966 — N° 521

CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS TÉNIFUGES DES COURGES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "Pharmacie"

présentée et soutenue publiquement le jeudi 2 juin 1966

PAR

Mme Françoise SEGUIN-BARBESSOU

PHARMACIENNE

née à Bordeaux-Caudéran (Gironde), le 14 juillet 1938

Examinateurs de la thèse :

MM. J. BAILENGER, professeur .... *Président*

R. CASTAGNOU, professeur ..... *Juges*

R. PAUTRIZEL, professeur ..... *Juges*

Mlle S. LARCEBAU, maître de conférences agrégé . *Juges*

1966

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT-PROPOS

Avant de commencer la lecture de cet exposé, qu'il nous soit permis d'adresser à ceux qui ont accepté aujourd'hui de constituer notre jury, l'expression de notre gratitude. Ce fut un honneur pour nous d'avoir été leur élève.

Que Monsieur le Professeur BAILENGER, chez qui nous n'avons trouvé que bienveillance et affabilité, veuille bien croire à nos sentiments de vive reconnaissance pour le très grand honneur qu'il nous fait en présidant notre thèse. C'est à lui que revient l'idée de ce modeste travail : ses conseils précieux nous ont aidés et guidés dans sa réalisation. Qu'il trouve ici nos remerciements pour les encouragements qu'il nous a toujours prodigués, pour sa patience de tous les instants, pour sa sollicitude jamais démentie à notre égard.

Remercions aussi Monsieur le Professeur PAUTRIZEL qui nous a toujours accueillis avec amabilité dans son laboratoire, et que nous sommes très honorés de compter parmi nos juges. Qu'il nous soit permis de dire ici notre respectueuse admiration et toute notre gratitude.

Nous n'oublierons pas non plus d'associer à cet hommage Madame SZERSNOVICZ, Chef de travaux pratiques au laboratoire d'Immunologie et de Biologie parasitaire qui nous a initiés aux techniques sérologiques ne ménageant ni son temps, ni sa peine, ni ses marques d'amitié.

Egalement un grand merci au personnel de notre laboratoire, qui nous ont particulièrement aidés dans notre tâche.

INTRODUCTION

Les propriétés ténifuges des semences de courge sont connues depuis bien des siècles. Pline l'Ancien en fait déjà mention.

D'après MAZZOTI et TREVINO (18), les Courges seraient originaires des Antilles et de l'Amérique tropicale. Cependant, c'est au Mexique que leur utilisation semble avoir été particulièrement répandue. En Europe, leur prescription s'établit aux environs de 1820, date à laquelle MONGENY (21), après un voyage à Cuba, en prescrit l'usage en thérapeutique. Ce médecin fait prendre, à ses malades, une bouillie préparée avec 90 grammes de semences fraîches et 100 grammes de miel. Il fractionne cette préparation en 3 doses qu'il administre à une heure d'intervalle. Dans la majorité des cas, l'expulsion du ver se produit 6 à 7 heures plus tard. En 1845, BRUNET (2) présente, à la Société de médecine de Bordeaux, deux observations montrant l'efficacité de la pâte de semences de courge, dans le traitement du ténia. CAZIN (5) en 1858, TARNEAU (40) en 1860 et GIRARD (10) en 1862, confirment ces résultats satisfaisants. A cette époque on donnait aux malades, les grainesbroyées, mélangées à des substances sucrées, soit sous forme de potion de TARNEAU * (41), soit en émulsion, soit en décoction. Ces différentes thérapeutiques étaient toujours suivies d'une purgation : généralement 30 grammes d'huile de ricin administrée au bout d'un laps de temps variable de l'ordre de 3 à 4 heures.

Dés 1865, des chercheurs essaient de déterminer la localisation du principe actif soit dans la drogue elle-même, soit dans les extraits qu'ils préparent. D'autres s'appliquent à définir la nature chimique de ce principe.

---

* Potion de TARNEAU

Graines mondées.....	50 g.
Sucre.....	qs pour aromatiser
Lait.....	120 ml

Les multiples travaux dont ce sujet a fait l'objet confirment tous, indiscutablement, l'action anthelminthique de la semence de courge. Cependant de nombreux problèmes restent encore à résoudre. Ils portent notamment sur la localisation et la nature du principe actif mais aussi sur différents facteurs susceptibles d'influencer l'activité tel que l'état des graines et l'espèce à utiliser.

Parmi toutes ces questions, nous retiendrons plus particulièrement celle relative à la localisation du principe actif. En soumettant les semences à des fractionnements progressifs, nous obtiendrons des extraits qui feront l'objet d'essais in vitro et in vivo. Avant de procéder à cette étude expérimentale, il nous est apparu nécessaire de faire une mise au point de l'état des travaux actuellement publiés dont les résultats semblent souvent être contradictoires.

- P L A N -

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I - ESPECES TENIFUGES

II - PROVENANCE GEOGRAPHIQUE

III - ETAT DES GRAINES

IV - CRITERES D'ACTIVITE

A - Essais in vitro

1 - Annélides

2 - Némathelminthes

3 - Plathelminthes

B - Essais in vivo

1 - Rongeurs

2 - Carnivores

V - LOCALISATION DU PRINCIPE ACTIF

A - Morphologie de la semence

B - Localisation proprement dite

1 - Testa

2 - Tegmen

3 - Amande

4 - Huile

5 - Tourteau

VI - NATURE DU PRINCIPE ACTIF

A - Principe hydrosoluble et thermostable

B - Résine

C - Oléorésine

D - Alcaloide

E - Glucoside

F - Saponine

ETUDE EXPERIMENTALE

I - ESPECES TENIFUGES, PROVENANCE, ETAT DES GRAINES

II - CRITERES D'ACTIVITE

A - Essais in vitro

1 - Hymenolepis nana

2 - Dicrocoelium dentriticum

B - Essais in vivo

1 - Sur la souris

2 - Sur le chien

C - Essais cliniques

III - LOCALISATION DU PRINCIPE ACTIF

A - Etude de la pulpe

1 - Essais sur *Dicrocoelium dentriticum*

a - préparation des extraits

b - résultats

2 - Essais sur l'homme

B - Etude de la semence entière

1 - Préparation des extraits

2 - Essais in vitro

C - Etude du testa

1 - Préparation de l'extrait

2 - Essais in vitro

D - Etude du Tegmen

1 - Préparation de l'extrait

2 - Essais in vitro

3 - Essais cliniques

E - Etude de l'amande

1 - Préparation de l'extrait

2 - Essais in vitro

3 - Essais cliniques

F - Etude de l'huile

1 - Extraction

2 - Essais

3 - Fractionnement

a - technique

b - essais

- de l'huile purifiée

- de l'éluat

G - Etude du tourteau

1 - Fractionnement

a - traitement par l'alcool à 70° au bain marie

b - traitement par l'alcool à 95° au Soxhlet

c - extraction alcoolique précédée d'une lixiviation éthérée.

2 - Etude de la fraction alcoolo-soluble - acétono-soluble

a - caractères

b - essais in vitro

c - essais sur l'animal

d - essais cliniques

Conclusions

3 - Etude de la fraction alcoolo-soluble - acétono-insoluble

a - caractères

b - essais in vitro

c - essais sur l'animal

d - essais cliniques

Conclusions

4 - Etude de l'action des deux fractions associées

a - essais sur l'animal

b - essais cliniques

CONCLUSIONS GENERALES

PREMIERE PARTIE

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

I -ESPECES TENIFUGES

La dénomination de courge s'applique à un grand nombre de plantes du genre Cucurbita, appartenant à la famille des Cucurbitacées. La faculté de se féconder entre elles et de produire des hybrides fertiles, entraine une confusion extrême parmi les espèces. Deux d'entre elles ont cependant une plus grande importance, chacune comportant plusieurs variétés :

- Cucurbita pepo désigne les "courgerons" dont les fruits sont sphériques, les "citrouilles" dont les fruits sont ovales, les "pâtissons" dont les fruits sont demi-sphériques et les "giraumonts" dont les fruits sont allongés, deux fois plus longs que larges.
- Cucurbita maxima correspond aux "potirons" dont les fruits sont plus gros, plus consistants, comprimés et comme ombiliqués aux deux extrémités.

Tous ces fruits sont des baies à pulpe charnue renfermant des graines.

L'origine géographique de ces plantes est très discutée et les publications concernant ce sujet sont souvent contradictoires :

- Cucurbita pepo aurait pour origine l'Amérique centrale ;
- Cucurbita maxima proviendrait vraisemblablement d'Amérique tropicale.

Les graines de ces deux espèces sont plus ou moins ovales et aplaties. Leurs dimensions varient de 18 à 20 mm de long, de 8 à 12 mm de large, et de 2 à 4 mm d'épaisseur. A l'une de leurs extrémités, elles présentent une partie rétrécie en forme de goulot ; elles sont bordées d'un bourrelet large de 1 à 2 mm.

En thérapeutique, en dépit des opinions émises, il semble que les

résultats aient été le plus généralement obtenus, indifféremment, avec les graines de courge fournies par Cucurbita pepo et C. maxima.

II - PROVENANCE GEOGRAPHIQUE

Cucurbita pepo et C. maxima mûrissent sous tous les climats et sont cultivées dans le monde entier. Dans certains pays, tel le Liban, les fruits ont un usage culinaire et les graines sont employées en médecine populaire dans le traitement du ténia. La taille des semences varie sensiblement avec leur origine ; les graines libanaises sont les plus charnues et les plus développées, celles provenant de Chine sont les plus petites.

Certains auteurs obtiennent des résultats variables selon la provenance des graines. Cette conception est mentionnée par KING (12) en 1864. SLOP (36) l'adopte également. SCHUBIGER (33) va jusqu'à affirmer que seules les semences de courge cultivées dans les pays méridionaux sont toxiques pour les Cestodes. SCHUBIGER base sa théorie sur les résultats peu encourageants obtenus par POWER et SALWAY (25). Ceux-ci administrent à leurs malades, l'huile obtenue par extraction avec l'éther de pétrole et la "résine" de la semence provenant de l'épuisement du tourteau par l'alcool ; l'expulsion du ténia ne se produit pour aucun des cas traités. Les auteurs concluent que les semences de courge ne possèdent aucun principe actif spécifique. SCHUBIGER attribue cette action négative à l'origine de la drogue. Pour lui, seules les semences récoltées dans les contrées Sud et notamment celles en provenance de Beyrouth et d'Ankara sont actives. Il nous semble indispensable d'insister sur le fait que POWER et SALWAY ont travaillé, non pas avec les semences entières, mais avec des fractions isolées : huile extraite par l'éther de pétrole, "résine" extraite par l'alcool. On ne peut s'empêcher de penser que l'absence d'activité constatée par ces auteurs soit dûe au fractionnement défavorable.

SEELKOPF et GRAAF (35) reprennent à leur tour cette notion du lieu d'origine : les semences en provenance du Proche-Orient manifestent, vis à vis des ténias, une toxicité beaucoup plus grande que celle des semences cultivées en Europe. Tout récemment, BADRE (1) constate de meilleurs résultats

avec les graines libanaises et chinoises.

Pour tous ces auteurs, l'intensité de l'action varierait donc selon l'origine géographique. Il est en effet possible que la chaleur favorise une concentration plus élevée du principe actif. Ce phénomène est bien connu en matière médicale ; l'exemple le plus classique est celui de l'opium dont la teneur en morphine croît à mesure que l'on se déplace de l'Est vers l'Ouest.

Quoi qu'il en soit, si les propriétés ténifuges sont maxima pour les graines provenant de fruits cultivés en pays chauds, cela n'exclue pas une certaine activité pour les produits cultivés en pays tempérés.

III- ETAT DES GRAINES

Pour de nombreux auteurs, la notion d'activité ténifuge de la drogue est influencée non seulement par sa provenance géographique mais encore par son état de fraîcheur. Parmi les nombreuses opinions contradictoires, nous retiendrons seulement celle de VEEN et COLLIER (44) ainsi que celle de SCHUBIGER (33) en faveur de l'utilisation des graines fraîches. Nous reviendrons sur ce point pour préciser notre point de vue d'après notre expérience.

IV- CRITERES D'ACTIVITE

Pour apprécier la valeur anthelminthique d'une substance, on a recours à deux procédés : soit aux essais in vitro qui portent sur des vers isolés, soit aux essais in vivo qui s'adressent aux parasites maintenus dans l'organisme aux détriments duquel ils vivent.

A - ESSAIS IN VITRO

Les essais in vitro ne peuvent être valablement accomplis qu'avec un organisme dont la sensibilité aux médicaments est du même ordre que celle

manifestée par le parasite sur lequel on désire agir. Il est souvent difficile, voire même impossible de se procurer, à l'état vivant, le parasite considéré et par la suite de le maintenir en vie. On fait alors appel à des animaux qui lui sont phylogéniquement apparentés mais qu'il est facile d'obtenir et de conserver vivants.

Ainsi, la difficulté de se procurer des Ténias "in toto" a orienté les chercheurs soit vers des Cestodes parasites d'animaux autres que l'homme, soit vers les Nématodes, soit enfin vers les Annélides. Le choix de tels réactifs biologiques n'est pas toujours heureux et mérite d'être discuté.

1 - Annélides

TRENDELENBURG (42) utilise des fragments de muscle du ver de terre Lumbricus terrestris, qu'il maintient en survie. Il enregistre graphiquement les contractions déterminées par la drogue en solution aqueuse. SCHNEIDER (30), dans son étude sur la santonine, s'adresse également au ver de terre mais entier.

Dans les travaux sur les semences de courge, SOLLMANN (37), PFISTER (24), NEELY et DAVY (22) retiennent aussi Lumbricus terrestris ; SCHUBIGER (33) choisit les Tubificidés, VALENTIN et BROCKELT (43) préfèrent les Enchytridés. Les tests décrits sont basés sur le temps de survie des vers mis au contact d'une solution du produit.

Les Annélides sont un matériel facile à se procurer et à maintenir en vie. Leur culture se fait en milieu à base de terre et leur survie dans l'eau est assurée pendant plusieurs jours. Les tests peuvent donc être facilement réalisés en milieu aqueux. En outre, ils présentent l'avantage d'être peu sensibles aux variations de température.

Cependant les Annélides et les Ténias, bien que phylogéniquement voisins, n'appartiennent pas au même embranchement zoologique ; leur morphologie, leur anatomie, leur physiologie présentent des différences importantes. Pour nous en rendre compte, il suffit d'opposer la vie libre des Annélides à l'état parasite des Cestodes.

2 - Némathelminthes

L'emploi des Annélides, dans les essais in vitro, ayant été critiqué, de nombreux auteurs ont préconisé l'emploi des Nématodes comme matériel d'étude des anthelminthiques.

Dès 1852, KUCHENMEISTER expérimente certains anthelminthiques sur l'Ascaris du porc. En 1885, VON SCHROEDER (32) rapporte les résultats d'expériences réalisées sur ce même Ascaris. Les méthodes qui utilisent ce ver sont encore largement employées.

Pour démontrer l'activité d'un principe isolé des graines de courge et qu'il identifie à un alcaloide, FREISE (9) décrit un test biologique faisant appel aux Ascaris et aux Oxyures. Pour les courges, ce critère semble devoir être particulièrement proscrit car elles ne manifestent in vivo aucune action vis à vis de ces Némathelminthes.

3 - Plathelminthes

L'insécurité des tests précédents conduit à leur préférer, toutes les fois qu'on le peut, l'utilisation des Plathelminthes et plus particulièrement des Cestodes.

En 1884, SCHROEDER (31), dans son travail sur la pellétierine, puis STRAUB (39), étudiant la fougère mâle, cherchent à évaluer le temps nécessaire pour provoquer la paralysie ou la mort de Cestodes du chat immergés dans une solution du produit à essayer. Plus tard, REBELLO, GOMES da COSTA et TOSCANO RICO (27), appliquent la méthode d'enregistrement graphique aux ténias du chien (Toenia serrata et Dipylidium caninum) ainsi qu'à Toenia saginata de l'homme.

BADRE (1), dans son expérimentation sur les semences de courge, suit la technique préconisée par l'école portugaise : les proglottis sont recueillis dans du liquide de Bunge* dont la température est maintenue aux

---

* Liquide de Bunge :

Chlorure de Sodium.....	10 g.
Carbonate de Sodium anhydre.....	1 g.
Eau distillée.....	1000 g.

environs de 37° C. Le test est effectué sur un segment placé dans du soluté de Tyrode. Son extrémité supérieure est reliée à un stylet inscripteur qui enregistre les contractions musculaires sur un papier enduit de noir de fumée. Après reprise des contractions spontanées du segment, on ajoute, dans le bain de Tyrode, le produit à tester. On observe s'il y a excitation ou paralysie et dans ce dernier cas si elle est réversible ou totale.

Cette technique d'enregistrement graphique apporterait des renseignements plus complets sur le mécanisme d'action de la substance : le degré de contraction, une excitation, une paralysie seraient autant de critères de l'activité anthelminthique. Mais, cette étude ne permet pas de conclure à l'effet possible de la drogue sur le scolex. De plus, la réalisation de ce test demande une préparation délicate et, plus encore, des segments en état de viabilité parfaite. Seuls peuvent être utilisés les anneaux émis spontanément ; en effet, l'expulsion provoquée par un médicament quel qu'en soit la nature, risque de donner des proglottis altérés dans leur comportement. Cette pratique expérimentale sur des segments de Toenia saginata n'est donc possible que dans les régions où le parasite est très fréquent. C'est en particulier, le cas de BADRE qui a travaillé au Liban, pays où les statistiques récentes montrent un taux d'infestation de 18 p. cent.

Les tests in vitro qui ont été décrits et que nous venons de résumer ne sont donc pas entièrement satisfaisants et ne semblent pas suffire pour apprécier l'efficacité d'une substance sur les ténias. Il est donc indispensable de pratiquer des essais in vivo chez des animaux porteurs de Cestodes.

B - ESSAIS IN VIVO

Les essais in vivo furent préconisés en 1876 par CARLBLOM (3) et VON RULLE (29), mais ce n'est que depuis 1940 qu'ils sont appliqués en pratique courante. Les premiers tests firent appel à la souris et au rat parasités par Hymenolepis nana et H. diminuta. En 1948, EHRARDT (8) s'adresse au chat et au chien infestés par Dipylidium caninum et Toenia crassicolis.

1 - Les Rongeurs

Chez la souris et le rat, la technique est la même : le plus simplement, on trie d'après leur parasitisme, des animaux que l'on répartit en deux lots. L'un d'eux est traité, pendant un temps donné, par la substance à essayer ; l'autre sert de témoin. A la fin du traitement, on estime l'activité anthelminthique par la présence ou non des oeufs dans les selles, contrôlée, après autopsie, par le dénombrement des vers dans l'intestin.

Ce procédé, qui emploie des souris spontanément parasitées, présente deux inconvénients : absence de contrôle de l'intensité du parasitisme, ignorance de l'état du développement des vers. Pour ces raisons, les conclusions thérapeutiques risquent d'être erronées. En tenant compte de ces remarques et dans le but d'obtenir un parasitisme plus régulier et mieux défini, CAVIER (4) met au point une technique s'adressant à des animaux expérimentalement infestés. Il utilise des souris blanches non parasitées, âgées de 6 semaines, époque la plus favorable à l'infestation. Il leur fait ingérer, par voie buccale, une suspension d'oeufs obtenus en dilacérant, dans le sérum physiologique, les derniers segments d'Hymenolepis nana adultes prélevés dans les intestins grêles de souris. Les oeufs doivent être mûrs c'est à dire renfermant un embryon hexacanthe. Il administre ainsi à chaque souris, 25 oeufs en suspension dans 0,25 ml de soluté physiologique. Quinze à vingt jours plus tard, le parasitisme est contrôlé par la recherche des oeufs dans les selles. La veille du jour fixé pour l'essai thérapeutique, les souris expérimentalement infestées sont laissées à jeun à partir de 18 heures. Elles disposent seulement d'une solution de saccharose à 5 p. 100. Le jour de l'essai, le ténifuge leur est administré par tubage gastrique, selon la technique décrite par WARD FERRILI (46) qui utilise une seringue à laquelle est adaptée une aiguille dont l'extrémité est munie d'un renflement olivaire, soigneusement poli, afin d'éviter la perforation de l'oesophage. Une quantité donnée du produit à étudier est mis en solution ou en suspension dans 0,25 à 0,50 ml d'un véhicule convenablement choisi. Quatre heures plus tard, les souris reçoivent, également par tubage gastrique, 0,25 ml d'une solution à 10 p. 100 de sulfate de sodium cristallisé (SO_4Na_2, 10 H_2O). Le lendemain, les souris sont autopsiées et on recherche dans l'intestin, les Hymenolepis éventuellement présents.

2 - Carnivores

On décrit également des essais de traitements pratiqués sur des chiens et des chats porteurs de Ténias. Le test est positif s'il n'y a pas de récidive dans les 3 mois.

C'est ainsi que KRAYER (15) expérimente un extrait délipidé de semences de courge sur des chiens parasités par Dipylidium caninum.

Ces essais in vivo sont d'une importance capitale dans la détermination de l'activité ténifuge ou ténicide d'une substance. Un extrait, isolé à la suite de multiples fractionnements, partiellement ou totalement inactif in vitro, peut manifester une réelle activité chez l'animal infesté. Dans le milieu intestinal, a lieu le contact entre le médicament et le parasite. Les sucs digestifs peuvent agir de façon favorable ou défavorable sur l'anthelminthique. Le pH, la présence plus ou moins importante de sels biliaires peuvent jouer un rôle dans l'activité du produit.

Si les renseignements que nous pouvons tirer des essais in vivo sont très importants, ils n'en sont pas moins incomplets : les ténias du chien, du chat et de l'homme n'appartiennent pas à la même espèce et leurs localisations intestinales diffèrent . Il est donc nécessaire, pour affirmer l'efficacité d'un anthelminthique en thérapeutique humaine, de recourir aux essais cliniques.

V - LOCALISATION DU PRINCIPE ACTIF

A - MORPHOLOGIE DE LA SEMENCE

Afin de pouvoir mieux comprendre les différentes hypothéses concernant la localisation du principe actif, il convient de rappeler la morphologie des semences de courge. Les descriptions changeant avec les auteurs, nous nous sommes efforcés de définir les appelations diverses et souvent imprécises.

La graine de courge comprend deux parties, la première faite des

enveloppes, la seconde de l'amande elle-même.

1 - Les enveloppes sont au nombre de deux : le testa et le tegmen

- Le testa est l'enveloppe la plus externe. Elle est épaisse et constituée d'une pellicule blanchâtre, mince, facilement détachable recouvrant l'écorce ou coque, de consistance cornée et de coloration brun clair.

- Le tegmen est mince, verdâtre, intimement adhérent à l'amande. Selon PERROT (23), ce serait les derniers vestiges de l'albumen.

2 - L'amande est essentiellement constituée par un petit embryon qui porte deux cotylédons plan-convexes, charnus, blanchâtres et huileux. Cette amande ne possède aucune odeur mais présente une saveur huileuse et fade.

L'émondage prive de leur testa les semences de courge qui ne sont plus alors formées que de l'amande enveloppée du tegmen.

HECKEL (11) étudie ce qu'il dénomme le "périsperme" et qu'il décrit comme étant composé de deux pellicules solidement liées. Il les sépare par macération prolongée dans l'eau. Pour les botanistes, le périsperme est constitué par les tissus de réserve de la plante et en particulier par l'albumen. Celui-ci est absent dans la semence de courge. D'après la description donnée, il semble que cet auteur veuille tout simplement désigner le testa.

VIGIER (45) et WOLFF (47) emploient également l'appellation de périsperme mais semblent lui conférer une signification plus restrictive en voulant désigner l'écorce privée de sa pellicule externe.

En s'appuyant sur les résultats fournis soit par des essais in vivo, soit par des essais in vitro, de nombreux chercheurs se sont appliqués à déterminer le constituant anatomique de la semence supportant l'activité ténifuge. Nous avons précédemment discuté la valeur des différents critères biologiques et l'on conçoit alors que les hypothèses les plus diverses aient été avancées : c'est ainsi que le testa, le tegmen, l'amande et ses divers composants ont été tour à tour retenus.

B - LOCALISATION PROPREMENT DITE

1 - Testa

HECKEL (11) en 1845, étudie plus particulièrement le "périsperme" qui, nous l'avons vu, semble en réalité désigner le testa. Il administre à 2 malades le périsperme puis une purge d'huile de ricin. Cette thérapeutique conduit à la guérison. Par contre, un échec est noté pour 4 malades qui absorbent les semences privées de leur périsperme puis une purge d'huile de ricin. D'après cette expérimentation, l'activité serait portée par le testa qui contiendrait la substance active à l'état de résine. Son action serait facilitée par l'huile de ricin agissant comme solvant.

Quelques années plus tard, VIGIER (45) reprend les travaux de HECKEL (11) et constate que l'activité des semences n'est pas modifiée après élimination du périsperme. De plus WOLFF (47) administre ce tégument sans succés.

En 1940, SCHUBIGER (33), prenant comme critère biologique les Tubificidés, étudie les propriétés anthelminthiques de l'écorce. Il émulsionne un fragment dans 5 ml d'eau. Les vers, après 24 heures de contact dans cette solution, sont vivants. Parallèlement, il fait la même expérience en prenant comme dissolvant l'huile d'olive afin de prouver que les résultats négatifs ne sont pas dûs à l'insolubilité du principe actif dans l'eau. Cette seconde expérience confirme l'inactivité de l'enveloppe externe de la semence. Ce test ne présente qu'une valeur restreinte car nous avons noté que le réactif mis en oeuvre est discutable.

Cependant, FREISE (9) et KRAYER (15) s'accordent à reconnaître que si l'écorce n'est pas un élément indispensable à l'expulsion du ténia, elle supporte sans nul doute une faible concentration en matériel actif.

2 - Tegmen

WOLFF (47) ayant démenti l'activité du testa, étudie l'importance du tegmen, membrane verte entourant l'embryon. En administrant 30 grammes de cette dernière, il provoque chez tous ses malades le rejet du ténia.

FREISE (9) rapporte des résultats satisfaisants obtenus avec une macération aqueuse de tegmen : 90 p. cent des Ascaris et Oxyures sont tués.

De même, SCHUBIGER (33) affirme que le tegmen supporte les deux tiers de l'activité ténifuge.

3 - Amande

La notion de localisation du principe actif dans le tegmen n'est pas admise par tous les auteurs. C'est ainsi que DUMAS (7) pense que la substance ténifuge ne réside pas dans les enveloppes de la graine mais essentiellement dans l'embryon et les cotylédons. D'autres chercheurs émettent des opinions plus nuancées. KRAYER (15), faisant des expériences sur des chiens, démontre que les semences de courge possèdent un élément réellement actif, localisé principalement dans l'amande. MERAT et de LENS (19), SOULE (38), CAZIN (5), MAZZOTI et TREVINO (18) confirment cette opinion.

Plutôt que d'étudier la localisation botanique, testa, tegmen, amande, certains auteurs essayèrent de décomposer les semences en deux fractions, d'une part l'huile, d'autre part le tourteau deshuilé.

4 - Huile

Pour certains, l'huile supporterait la majeure partie de l'activité anthelminthique. RATH (26) pense que c'est l'huile qui est responsable de l'efficacité de la graine. KING (12) recommande l'emploi de cette fraction à la place des semences entières. Il rapporte une guérison obtenue après en avoir administrée 45 ml. SLOP (36) admet également cette opinion et précise les doses d'utilisation : 15 à 20 grammes sont nécessaires à l'expulsion du ténia.

Mais ces auteurs négligent de mentionner si le traitement est réalisé avec l'huile recueillie par simple expression des semences ou si au contraire elle est obtenue par épuisement avec un solvant et quel solvant.

Pour WOLFF (47) seule la fraction huileuse soluble dans l'éther et

le chloroforme permet le rejet du ténia ; celle obtenue par simple pression ne posséde qu'une très faible activité. MINNER (20) et PFISTER (24) adoptent également cette opinion : l'huile exprimée ne possède aucune action spécifique. Au contraire, POWER et SALWAY (25), de même que SCHUBIGER (33), attribuent une grande activité anthelminthique à l'huile extraite par expression. SCHUBIGER réalise l'expérience suivante : il exprime 5 kilos de drogue à froid et à chaud sous une pression de 3 atmosphères. Les vers de terre, utilisés comme critère biologique, mis en contact de l'huile, survivent 3 heures. Les Tubifex témoins, placés dans l'huile d'olive, restent vivants après 24 heures. NEELY et DAVY (22) réalisent une expérience identique en employant le ver de terre Lumbricus terrestris. De même, VALENTIN et BROCKELT (43) étudient l'activité de l'huile sur les Enchytridés. Dans ces deux derniers essais, cette fraction est incapable de tuer les vers.

Comme l'on peut s'en rendre compte, les opinions les plus diverses et les plus contradictoires ont été avancées. Les divergences tiennent essentiellement à la diversité des conditions dans lesquelles se placent les auteurs : procédés d'extraction, critères d'activité notamment.

5 - Tourteau

Le tourteau, farine obtenue après déshuilage des graines, présente des qualités différentes selon le mode de traitement.

SCHUBIGER (33) émulsionne le tourteau déshuilé par simple pression des semences de courge. Les Tubifex en expérience sont tués.

Les études dont a fait l'objet cette fraction ont essentiellement été poursuivies pour essayer de préciser la nature du principe actif.

VI - NATURE DU PRINCIPE ACTIF

En 1861, LASSERRE pose le problème : l'action des semences de courge est-elle spécifique ou repose-t-elle sur des "principes albumineux

huileux" répandus dans le régne végétal ?. Pour y répondre, il fait l'expérience suivante : il donne à un porteur de ténia une pâte préparée avec 120 grammes d'amandes douces et deux heures après, une purgation de sulfate de magnésium. Cette médication provoque 6 selles sans aucune influence sur le ver. Quatre jours plus tard, le même malade prend 60 grammes d'eau de Sedlitz* puis 2 heures après, 60 grammes de semences de courge mélangées à la même quantité de sucre. Dix huit heures après ce traitement, le malade prend une purgation de sulfate de magnésium, identique à celle de la première expérience. L'expulsion du ténia se produit deux heures plus tard.

De cette expérience, LASSERRE conclue à la présence, dans la semence de courge, d'un principe actif, spécifique du traitement des ténias.

Dès cette date, les chercheurs essaient de déterminer la nature chimique du principe actif et d'en définir les constantes physiques.

A - PRINCIPE HYDROSOLUBLE ET THERMOSTABLE

En 1918, SOLIMANN (37) est particulièrement interessé par le fait que la fraction active semble hydrosoluble.

En 1931, NEELY et DAVY (22) épuisent les semences de courge par l'éther de pétrole, afin d'en extraire l'huile fixe, puis par l'alcool à 75°. Le percolat, distillé sous pression réduite, donne un résidu qu'ils solubilisent dans l'eau. Cette solution aqueuse est mortelle pour le ver de terre.

En 1935, PFISTER (24) pense que le principe actif est un constituant volatil entrainable par la vapeur d'eau.

---

* Eau de Sedlitz : Sulfate de magnésium..... 30 g.
Carbonate de sodium..... 4 g.
Acide tartrique cristallisé..... 4 g.
Eau distillée..... 650 ml

En 1937, KRAYER (15) traite ses malades en leur donnant un extrait aqueux. Il épuise les semences de courge par deux fois leur poids d'eau. Après réduction à l'ébullition, il administre avec succès son extrait, préalablement tamisé.

COLORADO, IRIS TREVINO, DOMINGUEZ et MAZZOTI (6) obtiennent, dans 70 p. 100 des cas, l'expulsion du ténia avec un extrait préparé en épuisant des semences décortiquées, par trois fois leur poids d'eau.

De même, VEEN, (44) et NITZULESCO confirment les succès obtenus avec une décoction aqueuse des semences.

Le principe actif serait donc une fraction présente dans l'extrait aqueux et qui posséderait la propriété de ne pas être altérée par la chaleur. La nature chimique de cette fraction hydrosoluble et thermorésistante n' est pas déterminée avec certitude. De nombreuses hypothèses sont avancées ; certains attribuent l'action à une résine ou une oléorésine ; d'autres suggèrent la présence d'un alcaloide, d'un glucoside ou d'une saponine.

B - RESINE

En 1875, HECKEL (11), attribue l'activité anthelminthique à une résine qu'il appelle "péporésine".

WOLFF (47) semble isoler la même substance par épuisement des semences deshuilées par un mélange chloroforme - alcool. Après évaporation des solvants, il reste une résine fluide, de coloration brun verdâtre, de goût amer. A la dose de 3 grammes, cette résine posséderait un caractère vermifuge.

SCHUBIGER (33) reprend les travaux de HECKEL (11) et isole, à son tour, une fraction résineuse. Après extraction alcoolique (50°) épuisement par des solvants organiques, précipitation des fractions inactives par l'hydroxyde de baryum et adsorption chromatographique, il obtient trois fractions différentes mais toutes actives sur Tubifex. Elles se présentent sous forme de masses brunes, amorphes, solubles dans l'eau et l'alcool.

SCHUBIGER, en accord avec de nombreux auteurs, conclue à la présence probable d'une résine.

Cependant il est nécessaire de faire remarquer que les résines sont toutes insolubles dans l'eau.

C - OLEORESINE

MINNER (20) extrait la semence pulvérisée par l'éther et après évaporation obtient un liquide épais, rouge, insoluble dans l'alcool qu'il identifie à une oléorésine. Administrée à la dose de 15 grammes, cette fraction permet l'expulsion de fragments importants de ténia. Mais cette notion d'oléorésine fut controversée par SCHUBIGER.

D - ALCALOIDE

FREISE (9) prétend avoir isolé un alcaloide cristallisé, localisé dans l'embryon. Il existerait à une concentration variant de 0,1 à 0,3 pour cent. Il serait peu soluble dans l'eau, l'alcool et le chloroforme.

Cette hypothèse de l'existence d'un alcaloide avait été, longtemps auparavant, niée par WOLFF (47) puis par KORILOW (14).

NEELY et DAVY (22) font une extraction en conjuguant l'action de l'éther de pétrole et de l'alcool à 75°. La distillation abandonne un résidu sirupeux tuant en 8 minutes les vers de terre mis en expérience. Cette fraction anthelminthique ne précipitant avec aucun des réactifs généraux des alcaloides ne peut être considérée comme tel. Ces deux auteurs n'ont pu déterminer avec certitude la nature du principe actif isolé. Ils précisent simplement les caractères de solubilité : soluble dans l'eau et l'alcool. De plus, ce principe est dialysable.

De même, LENDLE (17) ne parvient pas à isoler une substance alcaloidique par épuisement de la drogue broyée par l'éther de pétrole.

E - GLUCOSIDE

KORILOW, DORNER, WOLKOWITSCH (13) essaient à leur tour de déterminer la nature du principe actif. Ils épuisent les semences pulvérisées successivement par l'éther, l'alcool à 95°, l'eau et l'acide chlorhydrique. L'extrait acide est filtré, évaporé, mélangé à 3 fois son volume d'alcool, décoloré par le noir animal et en dernier lieu évaporé au bain-marie.

Après dessication sur acide sulfurique, ils obtiennent un produit sans azote, presque incolore, cristallisant en feuille. Ils l'identifient à un glucoside, insoluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, et le dénomment "Cucurbitène".

Quelques années plus tard, KORILOW (14) veut étudier le "Cucurbitène" qu'il avait réussi à isoler en collaboration avec DORNER et WOLKOWITSCH. Il suit la technique préconisée par ces auteurs mais obtient une masse hygroscopique non azotée qu'il ne peut en aucune façon assimiler à un glucoside.

F - SAPONINE

Plus récemment, au cours d'un travail qui fit l'objet de sa thèse, BADRE (1) essaie d'étudier plus particulièrement ce problème. Cet auteur procède à une recherche systématique des hétérosides, alcaloides et saponines.

Par le dosage du pouvoir réducteur initial et après action de l'invertine, de l'émulsine et hydrolyse acide, BADRE conclue à l'absence probable de β glucosides et d'autres hétérosides.

La présence d'alcaloide lui paraît pour le moins douteuse : la chromatographie de partage sur papier ne donne aucun résultat ; les méthodes par affrontement sur lame par les réactions de précipitations* ne sont guère

---

*réactif de BOUCHARDAT : (iodo-ioduré)
réactif de MEYER : (ido-mercurique)
réactif de DRAGGENDORF: (iodo bismuthique)

significatives.

De ces travaux, il conclue à la présence plus vraisemblable d'une saponine. Les semences de courge, dégraissées à l'éther de pétrole, sont réduites en poudre demi-fine. Les sucres sont séparés en mettant à profit leur insolubilité dans l'alcool méthylique froid. Dans ces conditions, les saponines sont solubles. L'extrait méthylique, après concentration jusqu'à consistance sirupeuse, mousse abondamment avec l'eau. La solution aqueuse est additionnée de charbon activé qui fixe la soponine éventuelle, laquelle est ensuite recueillie par dissolution dans l'alcool méthylique. La solution méthanolique est précipitée par l'éther. Sur la poudre obtenue, l'index mousse et l'index hémolytique sont déterminés.

Les résultats portent BADRE à conclure à la présence d'une saponine. Toutefois, il ne peut être absolument affirmatif car il n'a pu procéder à des essais chimiques et en particulier aux essais d'hydrolyse pour isoler et caractériser la sapogénine.

CONCLUSIONS

En résumé, les propriétés ténifuges des semences de courge sont reconnues depuis très longtemps et ont suscité très tôt l'intérêt des chercheurs. Si l'emploi d'une espèce provenant des pays chauds est recommandé par un grand nombre d'entre eux, les recherches n'ont pas encore réussi à déterminer avec certitude la localisation du principe actif non plus que sa nature chimique. Les divergences des résultats s'expliquent aisément en tenant compte non seulement de la spécificité des critères biologiques d'activité mis en oeuvre, mais aussi de la diversité des procédés d'extraction utilisés.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

Dans notre étude bibliographique, nous avons montré les opinions contradictoires émises par les auteurs, et relatives à l'espèce des semences à prescrire en thérapeutique. Leur origine et leur état de fraîcheur ont été également largement discutés. Notre expérience nous a permis la mise au point qui s'imposait. Après quoi, nous avons essayé de poursuivre les recherches déjà entreprises en vue de localiser le principe actif, problème non encore résolu de façon satisfaisante. Nous avons travaillé, dans un premier temps, sur les constituants botaniques de la graine, testa, tegmen, amande. Dans un deuxième temps, nous avons délipidé les semences mondées afin de soumettre l'huile et le tourteau à des fractionnements progressifs. Les différents extraits obtenus sont testés du point de vue de leur activité ténifuge, au moyen de critères que nous avons choisiset mis au point afin de se placer dans des conditions aussi voisines que possible de celles qui sont réalisées avec les tenias humains sur lesquels le médicament doit agir.

I - ESPECES TENIFUGES, PROVENANCE, ETAT DES GRAINES

Pour réaliser notre étude, nous avons travaillé sur deux variétés de Cucurbita pepo, cultivées dans notre région : la Courge de Touraine et le Giraumont d'Eysines. Leurs graines ont dans tous les cas été utilisées après avoir été séchées.

Pour apprécier leur activité ténifuge, nous les avons soumis à des essais sur la souris et chez l'homme.

1 - Essais sur la souris

Les semences décortiquées sont broyées finement ; la poudre est administrée à deux souris. Les animaux en expérience sont traités pendant une période variant de 4 à 6 jours. On leur fait ingérer 1,50 g., par souris et par jour. Pendant la durée du traitement, l'élimination des oeufs d'Hymeno lepis nana est recherchée quotidiennement. Quand l'examen coprologique se révèle négatif, on autopsie les animaux.

- Lors d'une première expérience, l'élimination des oeufs cesse le 5ème jour. L'autopsie confirme l'absence de ténias.
- Lors d'une deuxième expérience, l'élimination des oeufs cesse le 4ème jour. A l'autopsie on dénombre 1 ténia vivant.

2 - Essais cliniques

- A un enfant de 18 mois parasité par Toenia saginata, nous avons donné des semences de courge mondées et broyées comme farine pour la préparation des bouillies répétées dans la journée. Malgré l'absence de purgation, l'enfant élimine un ténia dont nous n'avons pu mettre en évidence le scolex. L'absence de récidive, après trois mois, confirme le succès de cette thérapeutique.

- Mademoiselle Renée D. 50 kgs parasitée par Toenia saginata prend la préparation suivante :

Bouillie de graines mondées et mixées..... 100 g.
Sucre..... 50 g.
Eau..... qsp pâte
Essence d'écorce d'oranges amères et rhum pour aromatiser

Trois quart d'heure après l'ingestion de cette pâte, la patiente prend une purgation de 30 g. d'huile de ricin. Il y a expulsion d'un Toenia saginata de 10,50 m avec scolex.

- Monsieur [illegible].70 kgs parasité par Toenia saginata, prend une bouillie faite de :

Semences mondées..... 100 g.
Sucre..... 50 g.
Eau..... qsp 150 ml
Rhum..... qs pour aromatiser

suivie 1 heure après d'une purgation à l'huile de ricin. Il y a rejet d'un ténia sans scolex, mais le malade revu 3 mois plus tard, confirme le succès de cette thérapeutique. Il est à noter que les anneaux, 24 heures après leur émission, conservent une légère contractilité montrant ainsi l'action ténifuge de la drogue.

Les multiples traitements que nous avons effectués (plus d'une centaine) ont été souvent appliqués après échec par d'autres thérapeutiques (oxyde d'étain, extrait éthéré de fougère mâle, pelletiérine par voie buccale et même tubage duodénal). Ils nous permettent d'affirmer que pour un adulte 100 grammes de semences sèches de Courge de Touraine ou de Giraumont d'Eysines cultivées sous notre climat suffisent pour l'expulsion du Toenia saginata.

Cette conclusion ne comporte pas d'éléments de comparaison avec des semences fraîches appartenant à d'autres espèces et ayant d'autres provenances. Elle doit donc être considérée en valeur absolue.

II - CRITERES D'ACTIVITE

Pour déterminer l'activité anthelminthique des différentes fractions isolées des semences de courge, nous avons eu recours à des essais in vitro et in vivo dont certains font l'objet d'une description originale et les autres, décrits par divers auteurs, ont été remaniés afin de les adapter à notre expérimentation.

A - ESSAIS IN VITRO

Ces essais portent d'une part sur Hymenolepis nana, Cestode parasite de la souris et accidentellement de l'homme et d'autre part sur Dicrocoelium dendriticum, Trématode parasite des canalicules biliaires des ovins et bovins notamment. Ils nous permettent d'apprécier l'activité des différentes fractions étudiées. Ils nous amènent à comprendre le mécanisme de l'action et à dissocier entre les activités ténifuges et ténicides. A ces termes, nous préférons ceux de platifuge et de platicide qui, en ayant un sens moins précis, s'adaptent mieux à nos essais qui portent non seulement sur des ténias (Hymenolepis) mais aussi sur d'autres plathelminthes (Dicrocoelium).

1 - Essais sur Hymenolepis nana (VON SIEBOLD 1852) BLANCHARD 1891

La souris est très souvent infestée par Hymenolepis nana. La fréquence de ce parasitisme varie d'une élevage à l'autre ; dans certains cas, nous avons été amenés à le réaliser expérimentalement en faisant ingérer aux souris des oeufs embryonnés.

Nous réalisons deux tests :

- Test a : On tue les animaux présentant des oeufs dans leurs déjections. On les autopsie afin d'isoler les vers localisés dans la partie terminale de l'iléon. A cet effet on ouvre longitudinalement l'intestin dans le soluté

de Ringer * contenu dans un verre de montre. On place le tout au réfrigérateur afin que les ténias se détachent de la muqueuse à laquelle ils sont fixés. Seuls sont mis en expérience, les Hymenolepis nana possèdant leur scolex. La substance à étudier est dissoute ou émulsionnée dans le soluté de Ringer ; on ajuste le pH de cette solution mère à 6,8 - 7,0. Puis on la dilue à des titres variables . Les différentes concentrations sont réparties par prises de 2 ml, dans des verres de montre. Dans chaque solution, on immerge 4 ou 5 Hymenolepis. Après un temps de contact de 1 heure, 2 heures puis 3 heures, on note la concentration active provoquant la paralysie des ténias. Ces derniers sont lavés puis maintenus dans du soluté de Ringer pendant 1 heure à 37° C. Dans ces conditions, on étudie si l'action manifestée est réversible ou non, ce qui nous indique si la substance possède une action platifuge ou platicide. Parallèlement à ces essais, on fait un témoin en immergeant des ténias dans le soluté de Ringer pur. Pour que le test soit valable, ceux-ci doivent rester vivants pendant toute la durée de l'expérience.

- Test b : Dans le but d'essayer de montrer, in vitro, le comportement du ver à l'égard de la muqueuse digestive en présence du ténifuge, nous pratiquons un test avec des Hymenolepis nana fixés sur l'iléon de la souris. L'intestin avec ses parasites est mis au contact des substances à étudier, dissoutes ou émulsionnées dans du soluté de Ringer, à concentrations variables et à pH neutre ; on note l'aspect des vers après deux heures puis trois heures de contact. Si après trois heures ils sont inertes, on procède à un lavage puis on les maintient 1 heure à 37° C dans du soluté de Ringer. On constate

---

* Soluté de Ringer

Chlorure de sodium	6 g.
Chlorure de potassium	0,10 g.
Chlorure de calcium	0,10 g.
Bicarbonate de sodium	0,10 g.
Eau distillée	100 ml

alors, s'ils reprennent leur mobilité initiale. On réalise parallélement un témoin, en mettant des ténias fixés sur l'iléon dans du soluté de Ringer pur.

2 - Essais sur Dicrocoelium dendriticum (RUDOLPHI, 1818) LOOSS, 1899

Les Douves que nous employons pour nos essais, proviennent des Abattoirs de Bordeaux. Nous transportons au Laboratoire, les foies parasités dont on extrait avec précaution les Trématodes, localisés dans les canalicules biliaires. On les lave plusieurs fois à l'eau physiologique à 37° C et on les maintient au réfrigérateur à + 4° C en attendant de les utiliser.

L'essai se pratique dans les mêmes conditions que celles décrites pour Hymenolepis nana en employant 8 à 10 petites douves. La lecture est faite trois heures après le début de l'expérience. Ce laps de temps écoulé, on note les douves immobiles ; on les lave avec le soluté de Ringer au contact duquel on les maintient 1 heure à 37° C afin de voir si elles redeviennent mobiles ou non. Les résultats ne peuvent être valables que si toutes les douves témoins sont vivantes après trois heures.

Nous avons réalisé ces tests avec des substances réputées pour leur activité sur les ténias : pellétiérine, arécoline, oxydes d'étain. Ceci nous permet :

1°) d'apprécier l'intérêt de ces critères dans le but que nous poursuivons ;

2°) de comparer leur sensibilité ;

3°) d'établir des références destinées à se faire une idée de la valeur ténifuge ou ténicide des fractions que nous avons isolées des courges.

Les tableaux I et II illustrés par le graphique III montrent que les deux réactifs biologiques - Hymenolepis et Dicrocoelium-sont valables et fournissent des résultats concordants.

TABLEAU I

ESSAIS DE QUELQUES ANTHELMINTHIQUES SUR HYMENOLEPIS NANA

	1/50	1/100	1/250	1/500	1/750	1/10.000
Témoins	mobiles	mobiles	mobiles	mobiles	mobiles	mobiles
Etain blanc (oxyde)	inertes contractés Platicide	inertes contractés Platicide	peu mobiles non contractés	mobiles	mobiles	
Etain noir (oxyde)	inertes contractés Platicide	inertes contractés Platicide	inertes contractés Platicide	inertes contractés Platifuge	mobiles	
Pelletiérine (sulfate)	inertes Platicide	inertes Platicide	mobiles			
Arécoline (bromhydrato)	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles Platicide	mobiles*

* Aux doses intermédiaires, 1/1000, 1/2000, 1/5000, l'action platicide se maintient.

TABLEAU II

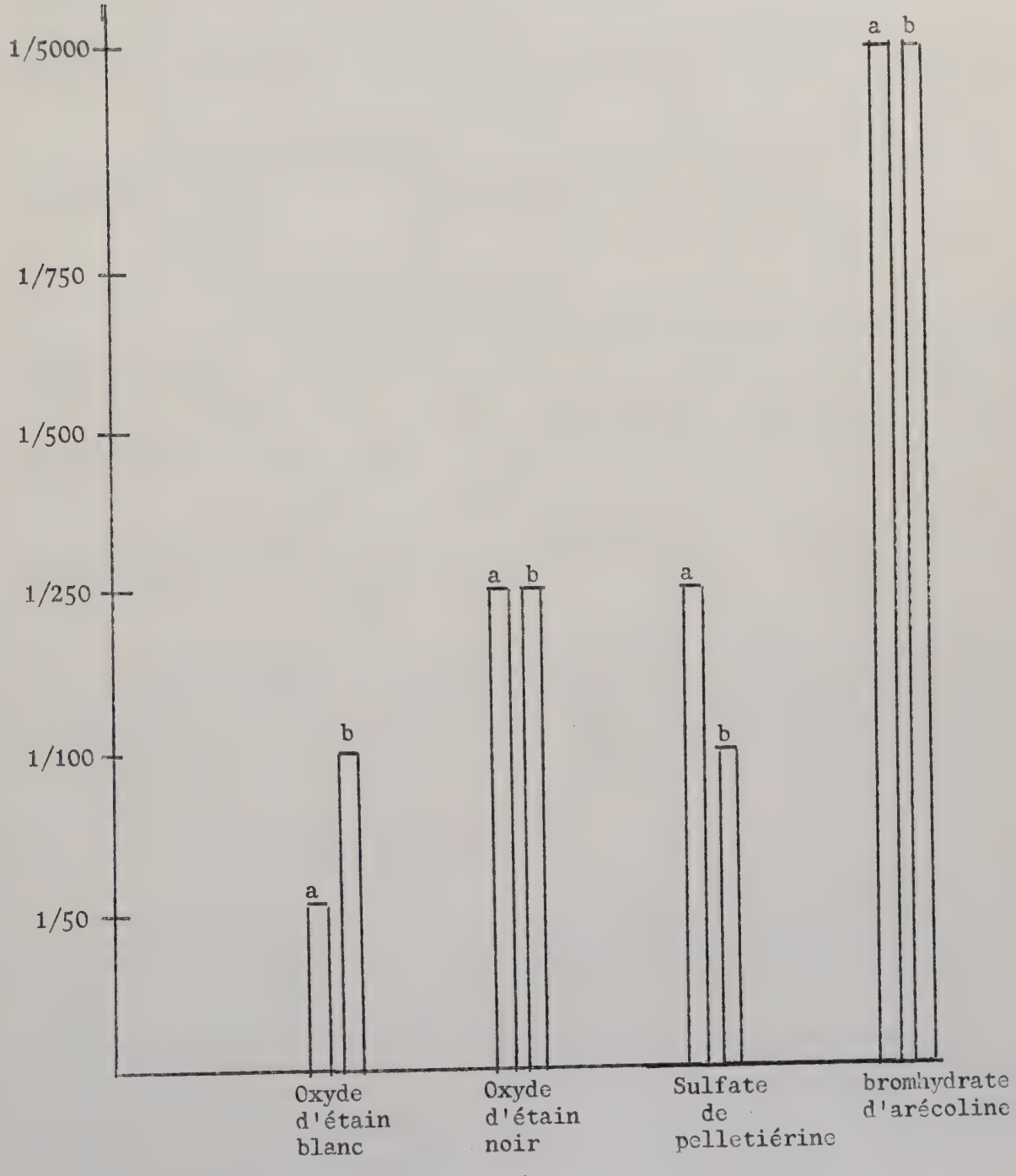
ESSAIS DE QUELQUES ANTHELMINTHIQUES SUR DICROCOELIUM DENDRITICUM

	1/50	1/100	1/250	1/500	1/750	1/10.000
Témoins	mobiles	mobiles	mobiles	mobiles	mobiles	mobiles
Oxyde d'étain blanc	immobiles Platicide	mobiles	mobiles	mobiles	mobiles	
Oxyde d'étain noir	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles Platicide	mobiles	mobiles	
Sulfate de pelletiérine	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles Platicide	mobiles	mobiles	
Bromhydrate d'arécoline	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles Platicide	immobiles* Platicide

* Aux doses intermédiaires 1/1000, 1/2000, 1/5000, l'action platicide se maintient.

GRAPHIQUE III

SENSIBILITES COMPAREES DE HYMENOLEPIS NANA DICROCOELIUM DENDRITICUM



a = Dicrocoelium dendriticum

b = Hymenolepis nana

B - ESSAIS IN VIVO

Certaines substances qui se comportent, in vitro, comme poisons à l'égard des Helminthes, peuvent se montrer, in vivo, soit inactives, soit toxiques pour l'hôte. Inversement, des médicaments peu actifs in vitro peuvent se révéler très efficaces chez l'animal et l'homme. C'est pourquoi, il est nécessaire de compléter l'étude d'un anthelminthique par des essais in vivo.

Nous avons expérimenté les extraits obtenus à partir de la semence de courge sur la souris et le chien parasités.

1 - Essais sur la souris

Le test se pratique sur deux lots d'animaux parasités par Hymenolepis nana. Le premier est traité avec la substance à étudier, le deuxième sert de témoin. A la fin du traitement, on estime l'activité anthelminthique par la recherche des oeufs dans les selles, complétée par l'autopsie des animaux.

Nous opérons suivant une technique dérivée de celle de CAVIER que nous avons précédemment rapportée.

Nous employons des souris spontanément parasitées, dont on contrôle le parasitisme par la recherche des oeufs dans les selles. De plus on administre 0,4 ml de sulfate de sodium à 10 p. 100, 2 heures seulement après l'administration du ténifuge à étudier.

2 - Essais sur le chien

La veille du traitement, on maintient l'animal à une diète hydrique. Le produit est administré soit en capsules, soit en pilules. Deux heures trente à trois heures après la prise de l'anthelminthique, on donne au chien un purgatif qui, dans la majorité des cas, consiste en 30 g. d'huile de ricin. Nous avons aussi été amenés à traiter un chat en lui faisant ingérer une émulsion du ténifuge mélangée à la viande. Dans ce dernier cas, nous n'avons pu donner de purgatif.

C - ESSAIS CLINIQUES

Les fractions ou extraits obtenus à partir des semences de courge sont administrés soit sous forme de poudre ou de bouillie lactée soit sous forme de pilules ou de capsules. Les doses variables prescrites sont toujours absorbées le matin à jeun et en une seule fois. On recommande la diète hydrique préalable afin de permettre une concentration suffisante du principe actif dans l'intestin. Deux à trois heures après la prise de l'anthelminthique, on administre un purgatif qui est le plus généralement 30 g. d'huile de ricin ou un mélange : Teinture de Jalap composée 15 g.- Sirop de Nerprun 15 g.

- Contrôle des résultats : En principe, seule la présence du scolex permet d'affirmer le succès de la cure ténifuge. Mais dans la majorité des cas, nous n'avons pu l'observer, soit qu'il y ait eu lavage du ver, soit que le ténia se soit rompu dans l'intestin à un niveau où il ne peut plus se fixer. Le seul critère suffisant, pour conclure à l'élimination du parasite, est alors l'absence de récidive après un laps de temps de trois mois.

III - LOCALISATION DU PRINCIPE ACTIF

Avant d'étudier les différents composants de la semence de courge, nous avons été amenés à soumettre à une expérimentation la pulpe du fruit, dont l'activité anthelminthique avait été mentionnée par NEELY et DAVY.

A - ETUDE DE LA PULPE

Un malade nous ayant signalé que l'absorption d'un potage au giraumont d'Eysines avait provoqué une expulsion de nombreux segments isolés et associés en chaîne, nous avons observé l'action de la pulpe sur Dicrocoelium dendriticum dans les conditions indiquées précédemment.

1 - Essais sur Dicrocoelium dendriticum

a - préparation des extraits

1) Extrait total de pulpe : La pulpe est broyée puis exprimée dans un nouet de mousseline. Le liquide obtenu est dilué avec un égal volume

de soluté de Ringer.

2) Extrait total aqueux à 40 p. 100 de pulpe deshydratée : 50 grammes de pulpe sont deshydratés à 50° C. Les 4 grammes obtenus sont repris par 10 ml d'eau. Après expression, la solution est amenée à un pH voisin de 7.

3) Extrait hydrosoluble à chaud : On épuise 300 grammes de pulpe au réfrigérant à reflux pendant 3 heures. Après filtration et évaporation sous pression réduite, on obtient une solution à pH = 3 que l'on amène à la neutralité en vue de l'essai.

4) Extrait alcoolosoluble : La pulpe deshydratée à 40° C est soumise à une extraction au réfrigérant à reflux par de l'alcool à 95°. On effectue deux traitements successifs, chacun d'une durée de 6 heures. Les liquides bruns obtenus sont mélangés puis divisés en deux fractions :

- L'une est filtrée à chaud puis évaporée au bain-marie. Elle fournit la fraction alcoolosoluble totale.

- L'autre est maintenue au réfrigérateur à + 4° C. Il apparaît un dépôt abondant que l'on deshydrate en vue d'un essai et qui constitue la fraction alcoolosoluble à chaud, insoluble à froid. Le filtrat correspondant est évaporé au bain marie et représente la fraction alcoolosoluble à chaud, soluble à froid.

b - résultats

Le test se pratique avec des extraits neutralisés dans les conditions précédemment décrites (voir page 31). Les résultats sont consignés dans le tableau IV.

Ces résultats sont en faveur de la présence d'un principe actif dans la pulpe qui provoque l'inertie et même la mort des douves en expérience Il est soluble dans l'alcool à froid.

2 - Essais sur l'homme

A une femme parasitée par Toenia saginata on donne 100 g. de pulpe deshydratée correspondant à 1250 g. de pulpe fraîche sous forme de saccharures granulés, suivie 2 heures après d'une purge teinture de Jalap composée 15 g. - Sirop de Nerprum 15 g. Aucun effet favorable n'a été observé.

TABLEAU IV

ETUDE DE LA PULPE : ACTION SUR DICROCOELIUM DENDRITICUM

	1 heure	3 heures	1 heure après lavage
Témoins	vivantes	vivantes	vivantes
Extrait total	vivantes	vivantes	vivantes
Extrait total aqueux à 40 p. 100	contractées	immobiles contractées	vivantes
Extrait hydrosoluble à chaud	contractées	faiblement mobiles	mobiles
Fraction alcoolosoluble totale	contractées	inertes contractées	immobiles décolorées
Fraction alcoolosoluble à chaud insoluble à froid	contractées	contractées mobiles	mobiles
Fraction alcoolosoluble à froid	contractées	contractées inertes	immobiles contractées

B - ETUDE DE LA SEMENCE ENTIERE

Afin de nous permettre d'orienter notre travail expérimental, nous avons essayé de déterminer, en partant de la semence entière, les caractères de solubilité du principe actif.

1 - Préparation des extraits :

- Lixiviation par l'éther de pétrole : On broie au mixer 108 grammes de semences. Après tamisage, on soumet la poudre à une lixiviation par l'éther de pétrole.

Nous opérons suivant la technique classique. On commence par une deshydratation à l'étuve dont la température n'excède pas 35° C pour conserver les substances volatiles éventuellement présentes. On élimine ainsi, l'eau retenue entre les différents éléments de la poudre. Cette dernière est humectée soigneusement dans un mortier avec de l'éther de pétrole (35° - 70°)*dont la quantité est calculée de manière à ce que le produit reste pulvérulent. On passe le mélange poudre - solvant à travers un tamis à larges mailles pour obtenir une masse homogène. On laisse le tout en vase clos et au repos pendant 4 heures. Ce laps de temps écoulé, on prend un percolateur dont on obture l'extrémité inférieure par un tampon de coton hydrophile d'une épaisseur de 4 cms. On introduit la poudre humectée et tamisée en la tassant légérement mais uniformément afin d'éviter la formation de cavités et de couches de consistances différentes. L'appareil étant ainsi rempli auxdeux tiers, on égalise la surface de la substance à épuiseret on la recouvre d'un papier filtre de diamètre égal à celui du percolateur. On en assure la fixité par quelques billes de verre. On ouvre le robinet inférieur et on verse peu à peu l'éther de pétrole. Quand il commence à s'écouler, on ajoute du solvant en quantité suffisante pour que la poudre soit entièrement recouverte et on ferme le robinet. Après 48 heures de macération, le solvant est coloré en vert. Il faut avoir soin d'ajouter du dissolvant fréquemment pour que le niveau soit constant au niveau de la poudre.

L'écoulement doit se poursuivre lentement et uniformément pour permettre à toutes les substances, dont les caractères de solubilité sont différen

* distillant entre 35° et 70°

tes, d'être tour à tour entraînées. La lixiviation est poursuivie jusqu'à épuisement complet. En fin d'opération, le solvant s'écoule coloré en jaune. Le mélange des différentes fractions lixiviées donne une solution fluorescente de coloration rouge. Après évaporation, il reste un résidu huileux rougeâtre qui est soumis à l'essai.

- Lixiviation alcoolique : Lorsque l'éther de pétrole s'écoule incolore, on poursuit la lixiviation par de l'alcool à 80°. Le solvant, coloré en vert, est évaporé sous pression réduite pour éliminer la totalité de l'alcool. Le résidu est soumis à l'essai.

- Macération aqueuse et entraînement par la vapeur d'eau : On broie au mixer 100 grammes de semences entières. Après macération de 12 heures dans de l'eau distillée, une partie est filtrée et le reste est soumis à un entraînement par la vapeur d'eau.

2 - Essais d'activité in vitro

Les essais sont pratiqués sur Dicrocoelium dendriticum et Hymenolepis nana dans les conditions précédemment décrites. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau V.

Conclusion

Nous pouvons donc conclure à la présence, dans les semences de courge, d'un principe actif spécifique du traitement du ténia, dont le solvant de choix semble être l'alcool et à un degré moindre l'éther de pétrole.

C - ETUDE DU TESTA

Divers auteurs ont émis l'hypothèse de la présence, dans le testa, du principe actif en grande quantité. Nous avons donc envisagé son étude en pratiquant un test sur Hymenolepis nana.

Le testa comprend, comme nous l'avons déjà décrit, une coque épaisse recouverte sur sa face externe d'une pellicule blanche et mince.

L'ensemble est souvent désigné sous le terme d'écorce.

TABLEAU V

ETUDE DES DIFFERENTES FRACTIONS ISOLEES DES SEMENCES ENTIERES

	2 heures	3 heures	1 heure après lavage
Témoins	vivantes	vivantes	vivantes
- a : Essais sur Dicrocoelium dendriticum			
Fraction soluble dans l'éther de pétrole	vivantes	immobiles	8 sur 17 vivantes mais peu mobiles 9 autres immobiles
Résidu de Lixiviation alcoolique	immobiles	immobiles	immobiles
Fraction entrainée par la vapeur d'eau	vivantes	vivantes	vivantes
- b : Essais sur Hymenolepis nana			
Macération aqueuse	vivants	vivants	vivants

1 - Préparation de l'extrait

On décortique les semences en prenant soin de ne pas détacher la pellicule verdâtre adhérent intimement à la face interne de la coque.

Le testa broyé est mis à macérer dans de l'eau physiologique pendant 12 heures puis filtré.

2 - Essais in vitro

Le test porte sur 2 Hymenolepis nana mis au contact du testa, 2 autres ténias placés dans de l'eau physiologique servent de témoins.

Vingt heures après le début de l'expérience, ces ténias sont toujours vivants.

Il semble donc que l'activité du testa soit négligeable ce qui justifie l'utilisation thérapeutique des semences mondées.

Cependant, dans la semence mondée, deux éléments peuvent agir spécifiquement sur le ténia, d'une part le tegmen et d'autre part l'amande. Nous avons ainsi été amenés à étudier ces deux composants afin d'essayer de déterminer quel élément supporte la plus grande activité.

D - ETUDE DU TEGMEN

Le tegmen qui est un tégument très mince et verdâtre, adhére intimement à l'amande. On le soumet à des essais in vitro et cliniques.

1 - Préparation de l'extrait

On détache le tegmen verdâtre de l'amande et on le coupe finement. On le place dans un nouet de mousseline au sein de dix fois son poids de soluté de Ringer. Après dix huit heures de contact, on exprime fortement. La solution est soumise à l'essai.

2 - Essais in vitro

- Les Hymenolepis nana mis au contact du produit de cette macération aqueuse meurent en moins d'une heure.

- Quant aux Dicrocoelium dendriticum, trois heures après le début de l'expérience effectuée selon les conditions décrites précédemment, elles sont immobiles et le demeurent après lavage et maintien de une heure dans le soluté de Ringer.

3 - Essai clinique

Il est très difficile d'isoler le tegmen de l'amande, aussi avons-nous eu recours à un artifice :

La semence mondée est broyée puis deshuilée par l'éther ; afin d'éliminer la farine la plus fine correspondant aux parties internes les plus friables, on effectue un tamisage. La partie externe de l'amande, recouverte du tegmen, forme une farine grossière verte qui est donnée à Madame L. 65 kgs parasitée par Toenia saginata, à la dose de 25 g. (soit 0,38 g. par kgs) sous forme de bouillie lactée. Une heure trente après l'absorption de cette préparation, la malade prend une purgation faite de 15 g. de teinture de Jalap composée et de 15 g. de sirop de Nerprun. Ce traitement provoque le rejet d'un ténia. Nous n'avons pu observer la présence du scolex mais la malade revue trois mois plus tard confirme l'absence de récidive.

On peut donc affirmer la très grande richesse du tegmen en principe actif.

E - ETUDE DE L'AMANDE

La présence du principe actif ténifuge à forte concentration dans le tegmen n'exclue pas sa localisation dans l'amande. Pour vérifier cette hypothèse, il est nécessaire d'enlever le tegmen qui forme une pellicule autour de l'amande.

1 - Préparation de l'extrait

On broie les amandes mondées privées de leur tegmen. La poudre est délayée dans une quantité déterminée de soluté de Ringer. Après 18 heures de contact, on récupère l'extrait par expression à l'aide d'un nouet de gaze.

2 - Essais in vitro

- Le liquide de macération obtenu en mettant en présence 1 partie de farine pour 10 parties de soluté de Ringer est inactif sur les Hymenolepis nana.

- Par contre, lorsque les proportions sont de 1 partie pour 4, les

douves sont tuées au bout de 1 heure.

3 - Essai clinique

A un enfant de 4 ans, parasité par Toenia saginata, on donne une bouillie lactée, préparée avec 25 g. de fine fleur obtenue après tamisage de la farine deshuilée par l'éther. La purgation de 15 g. d'huile de ricin est administrée en deux fois. L'enfant expulse un grand fragment de ténia mais un mois plus tard l'émission des anneaux recommence.

Conclusions

L'efficacité de l'amande semble donc incontestable.

Nous avons ainsi étudié la semence du point de vue de la répartition du principe actif dans ses différents constituants botaniques. Il convient dans une étude plus poussée, de la soumettre à des fractionnements chimiques. Nous avons travaillé d'une part sur l'huile, et d'autre part sur le tourteau.

F - ETUDE DE L'HUILE

1 - Extraction

Les semences de courge sont mondées afin d'en éliminer le testa qui ne semble pas supporter l'activité physiologique. Les amandes recouvertes de tegmen sont broyées, et après tamisage, on obtient une poudre homogène, de coloration jaune verdâtre, riche en huile. On la soumet à une lixiviation à froid par l'éther de pétrole. Nous opérons suivant la technique que nous avons précédemment exposée.

La fraction soluble dans l'éther de pétrole se présente sous forme d'une huile de consistance très visqueuse, représentant 450 g. p. 1000 du poids des semences mondées. Elle est de coloration verte et présente une intense fluorescence rouge à 3 650 A.

2 - Essai

Monsieur F. parasité par Toenia saginata prend 80 grammes d'huile

de courge pure. Deux heures après la fin du traitement, il prend une purge de 30 g. d'huile de ricin. L'élimination des segments ne s'interrompt pas.

3 - Fractionnement

Nous avons effectué un fractionnement dans le cas où le principe actif serait présent dans l'huile à très faible concentration.

a - Technique

La coloration verte de l'huile est due à des pigments que l'on sépare par chromatographie sur colonne. A cet effet, on emploie l'alumine N° 40. Nous opérons avec un tube à adsorption vertical adapté sur une fiole à vide dans lequel on introduit un petit tampon de coton qui sert à en obturer l'extrémité inférieure. L'alumine est introduite par petite quantité, et, entre chaque addition, on tasse soigneusement afin de réaliser une colonne homogène. Quand le tube est rempli aux deux-tiers, on recouvre d'un papier filtre que l'on maintient fixe par quelques billes de verre, afin d'empêcher la désagrégation de l'alumine lors du passage de l'huile. Pour parfaire l'homogénéite de la colonne, on ajoute un peu d'éther de pétrole et on tasse à nouveau. L'huile est mise en solution dans l'éther de pétrole additionné d'éther ; la quantité de chacun des deux solvants a été déterminée au cours d'essais préalables. Nous obtenons les meilleurs résultats en prenant un mélange renfermant 95 p. 100 d'éther de pétrole et 5 p. 100 d'éther. Dans ces conditions, la fixation est moindre, l'élution est facile et plus complète. Pour favoriser la formation de zones distinctes, la filtration doit être lente. On poursuit l'écoulement du solvant jusqu'à ce qu'il n'abandonne plus de résidu huileux.

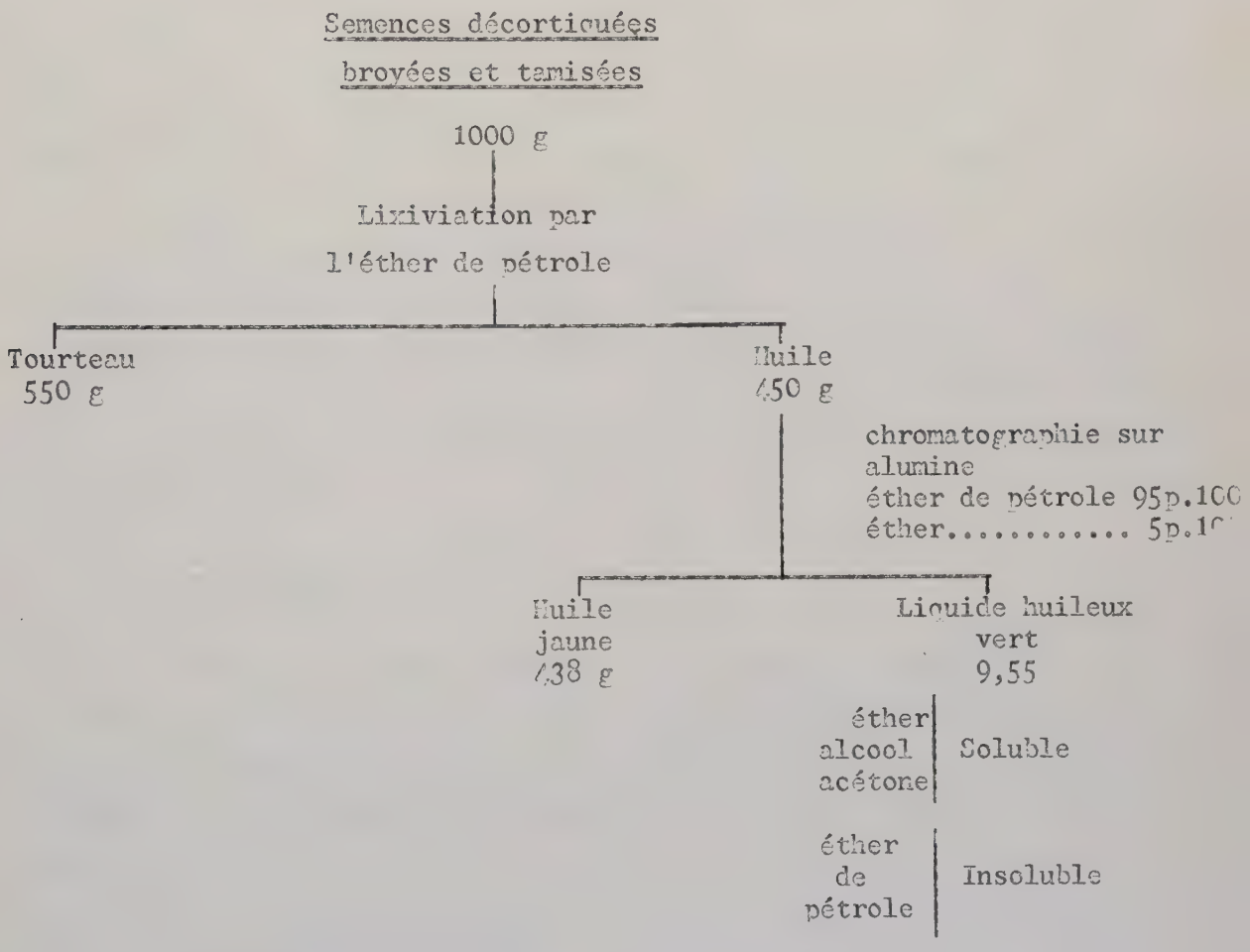
Dans la fiole à vide, on recueille une huile jaune d'or, qui, après évaporation des solvants, représente 438 g. du poids initial des semences. La colonne d'alumine présente, à sa partie supérieure, un liseré vert intense, fluorescent rouge, témoin de la fixation des pigments. Le chromatogramme est développé avec l'éther de pétrole 35° - 70° à 5 p. 100 d'éther qui entraîne l'huile restée adsorbée. On poursuit l'élution avec un mélange à 10 p. 100 puis à 50 p. 100 d'éther. Le liquide entraînant les pigments verts présente une intense fluorescence rouge aux U.V. et

abandonne un résidu huileux vert sombre représentant 9,55 g pour 1 kg de semences. Il est entièrement soluble dans l'éther, l'alcool, l'acétone mais se trouble avec l'éther de pétrole.

L'extraction et le traitement de l'huile sont résumés dans le tableau VI :

TABLEAU VI

EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DE L'HUILE



b - Essais

1°) Essais de l'huile purifiée

La fraction huileuse purifiée a été administrée à 5 souris à la dose de 0,5 ml. On constate que 1 souris est déparasitée, quant aux 4 autres elles possèdent de nombreux ténias.

2°) Essais de l'éluat

- essais sur Hymenolepis nana

Le test se pratique en suivant les conditions décrites précédemment. Les Hymenolepis nana maintenus fixés sur l'iléon de la souris sont immergés dans du soluté de Ringer contenant 20 mg par ml de la fraction à étudier. Les ténias ont un comportement identique aux témoins : ils sont mobiles et détachés.

- essais sur la souris

Nous opérons suivant la technique de CAVIER précédemment rapportée. Le test porte sur 5 souris qui reçoivent chacune 100 mg de la fraction éluée (soit 5 g. par kgs d'animal) mis en solution dans 0,5 ml d'huile de courge. L'analyse coprologique pratiquée est négative. L'autopsie révèle de nombreux ténias fixés mais dont la longueur n'excède pas 2 cms.

Nous avons recommencé une nouvelle expérience en donnant à 5 souris, une dose 5 fois supérieure à celle précédemment administrée, et en la solubilisant dans l'huile de courge. Deux animaux ne présentent plus d'oeufs dans leurs déjections, leur déparasitation étant confirmée par l'autopsie. Les trois autres souris, au contraire, ont une coprologie positive. Chez les souris témoins, qui reçoivent 0,5 ml d'huile de courge purifiée, on observe de nombreux ténias.

Conclusions

L'huile de courge obtenue par lixiviation à l'éther de pétrole ne semble pas être active. Cependant, il est possible par chromatographie sur colonne d'alumine d'isoler une fraction représentant 2 p. 100 du poids de l'huile et qui manifesterait une légère action si l'on s'en tient aux résultats obtenus.

G - ETUDE DU TOURTEAU

Le tourteau, qui représente 550 g. p. 1000 du poids initial de la drogue, est constitué par la farine deshuilée obtenue après lixiviation de la semence décortiquée par l'éther de pétrole. Nous l'avons fractionné, les extraits obtenus étant tour à tour soumis à une expérimentation.

1 - Fractionnement

Le tourteau a été épuisé soit par l'alcool à 70° au bain marie, soit par l'alcool à 95° au Soxhlet, soit enfin par lixiviation éthérée suivie d'une extraction alcoolique.

- a) Traitement par l'alcool à 70° au bain marie : Par deux fois, on traite le tourteau par l'alcool à 70° au bain-marie bouillant et au réfrigérant à reflux. Après filtration à chaud, nous obtenons un liquide vert, limpide, qui par refroidissement abandonne un précipité important. La solution alcoolique, non extractible par l'éther de pétrole, est agitée avec l'éther en présence d'eau ; on en sépare deux fractions :

- Une phase éthérée verte précipitant par l'éther de pétrole mais soluble dans l'acétone, l'éther et l'alcool. Nous l'appelerons fraction alcoolo-acétono-soluble.

- Une phase hydroalcoolique incolore ou faiblement jaunâtre qui précipite par l'acétone, l'éther et l'éther de pétrole. Nous l'appelerons fraction alcoolo-soluble, acétono-insoluble.

- b) Traitement par l'alcool à 95° au Soxhlet : Nous avons soumis les semences à une extraction plus poussée en employant l'alcool à 95°.

Le tourteau malaxé avec l'alcool à 95° est placé dans la cartouche où il est épuisé à chaud par ce même solvant. En fin d'opération, on obtient un liquide vert, limpide à chaud, mais qui se trouble par refroidissement. Après distillation de l'alcool sous pression réduite et au bain-marie, le résidu précipite abondamment par l'acétone. On peut ainsi séparer :

- Une fraction alcoolo-soluble - acétono-soluble identique à celle obtenue précédemment ;

- Une fraction alcoolo-soluble - acétono-insoluble identique à la phase hydro-alcoolique précédente.

Afin d'extraire la totalité de cette dernière fraction, on répète le traitement au Soxhlet et on précipite par l'acétone le résidu d'évaporation de la fraction alcoolique. Le précipité est purifié par lavage avec l'acétone jusqu'à ce que ce solvant soit incolore. Après évaporation de l'acétone, on obtient une masse brune qui représente 33, 37 g. p. 100 du poids initial.

- c) Extraction alcoolique précédée d'une lixiviation éthérée : Les extractions précédentes nous ayant montré la présence d'une fraction huileuse, nous nous sommes proposés de faire un épuisement par l'éther.

On opére la lixiviation en suivant les conditions décrites précédemment lors de l'expérimentation sur la semence entière.

La solution éthérée s'écoule colorée en vert et présente une intense fluorescence rouge aux U.V. Par évaporation sous pression réduite au bain-marie, l'éther abandonne une fraction huileuse vert sombre de consistance épaisse, représentant 20, 93 g. pour 1 kg de semences *.

La farine deshuilée, contenue dans le percolateur, est soumise à deux extractions : la première par l'alcool à 95° immédiatement suivie d'un deuxième épuisement par l'alcool à 70° par lixiviation à froid puis à chaud. Après distillation du solvant au bain-marie, le résidu précipite abondamment par l'acétone en donnant une masse brune représentant 37, 22 g. pour 1000 g. de semences décortiquées

Tous ces traitements sont résumés dans le tableau VII.

Ainsi ces différentes extractions nous conduisent toutes à l'obtention de deux fractions qui semblent dignes d'intérêt :

- l'une alcoolo-soluble-acétono-soluble ;
- l'autre alcoolo-soluble-acétono-insoluble.

dont nous nous proposons d'étudier l'activité ténifuge tant in vitro qu'in vivo.

2 - Etude de la fraction alcoolo-soluble - acétono-soluble

- a) caractères : Cette fraction se présente sous forme d'un liquide vert et épais donnant aux U.V. une intense fluorescence rouge. Il est soluble

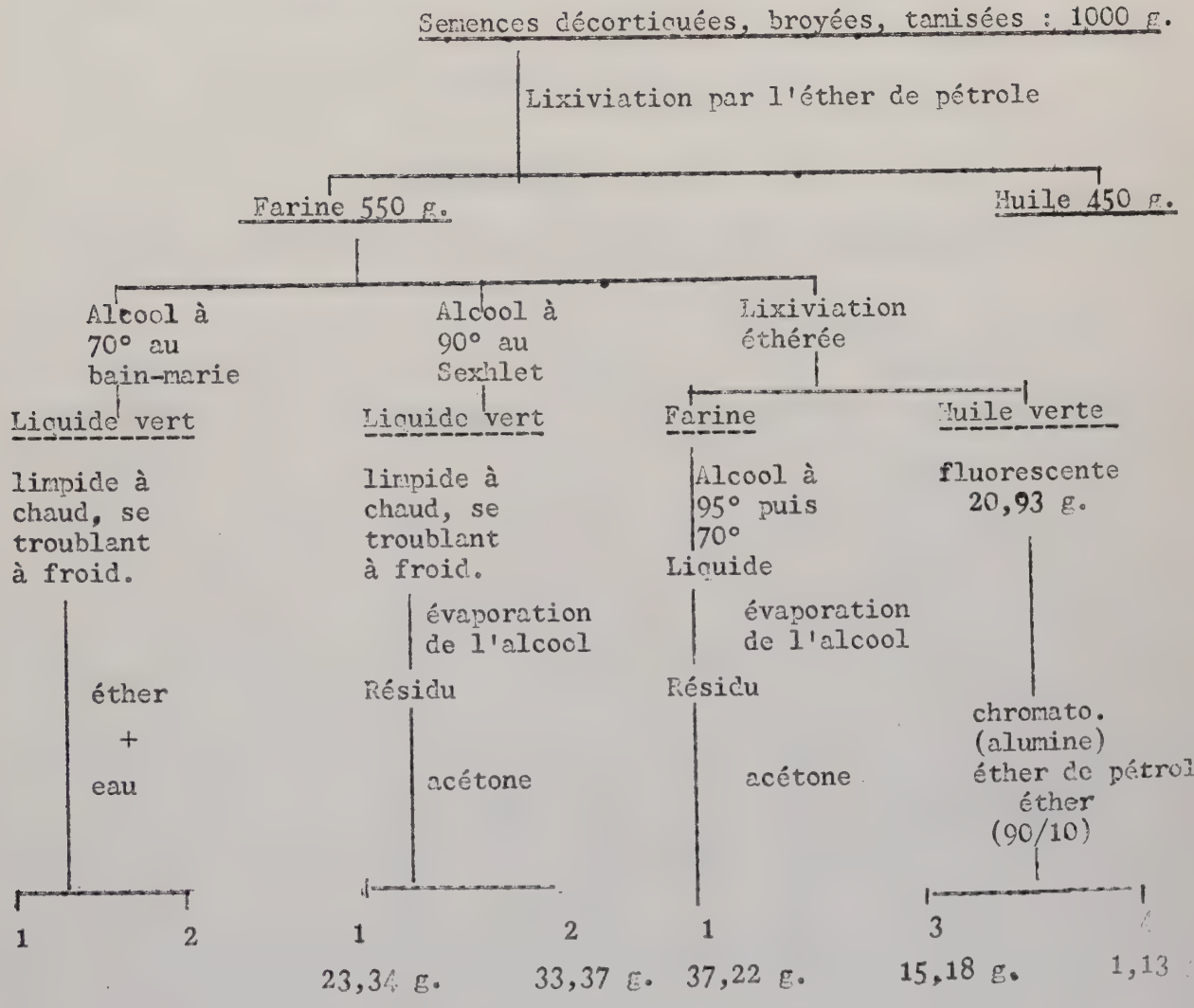
---

*N.B. obtention de l'huile :

La fraction huileuse a été soumise à un traitement semblable au précédent : passage sur colonne d'alumine et élution éthérée. Le liquide huileux vert semble être doué des mêmes caractères que celui déjà obtenu. Il semble que l'extraction éthérée pousse le fractionnement beaucoup plus loin.

TABLEAU VII

RESUME DES EXTRACTIONS ET DES RENDEMENTS

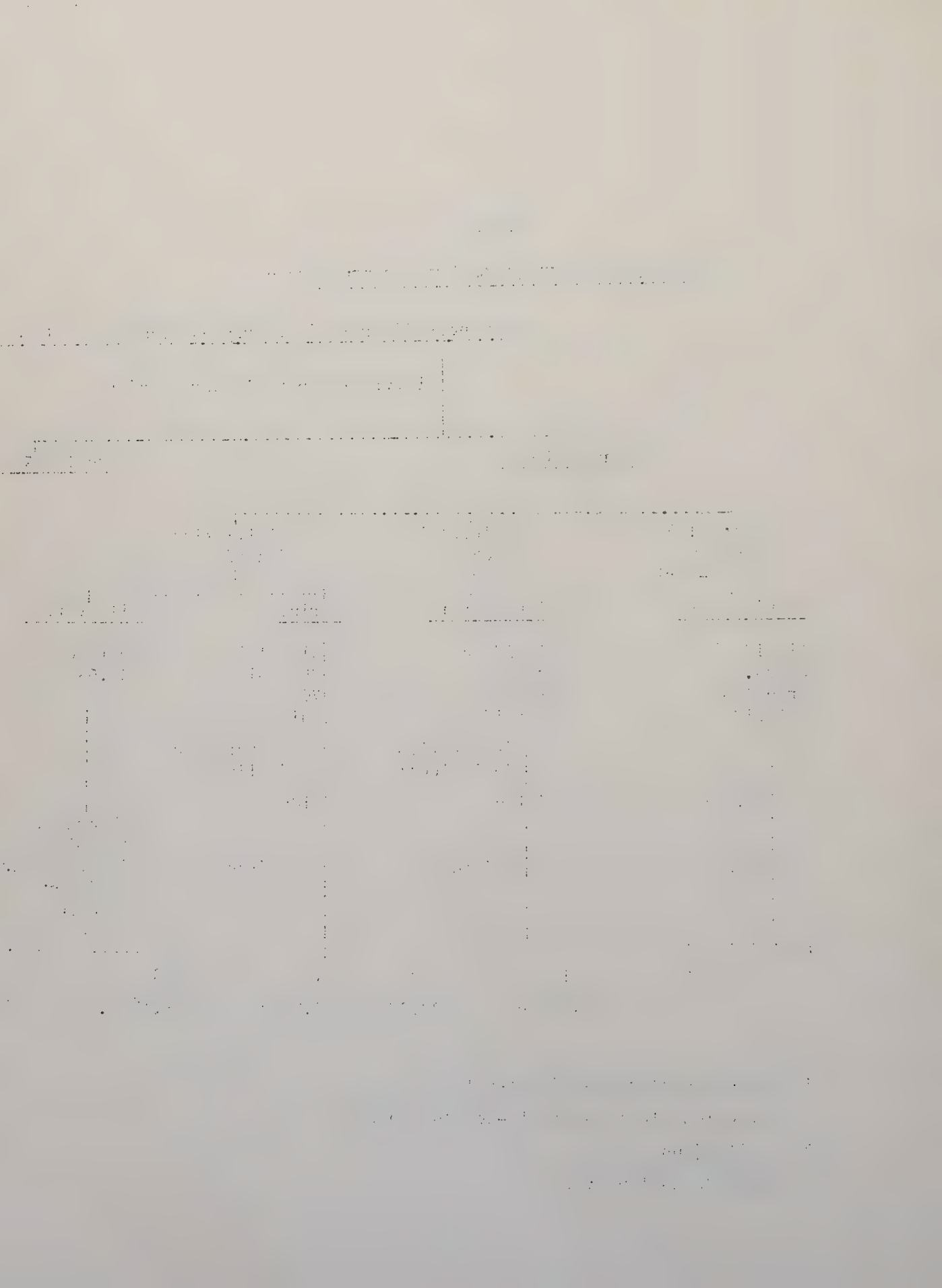


1 = Fraction alcoolo-acétono-soluble

2 = Fraction alcoolo-soluble-acétono-soluble

3 = Huile jaune

4 = Liquide huileux vert.



dans l'éther et l'acétone, partiellement soluble dans l'alcool à 95°, mais précipite avec l'éther de pétrole en abandonnant un résidu vert. L'activité de cette fraction est mise en évidence par des essais in vitro et in vivo.

- b) essais in vitro

Action sur Hymenolepis nana

Nous opérons suivant la technique décrite précédemment en ayant soin de se placer à un pH voisin de 7. L'action de cette fraction est étudiée en fonction de sa concentration. Après 1 heure, puis 2 heures de contact, on examine les ténias.

Les résultats sont résumés dans le tableau VIII

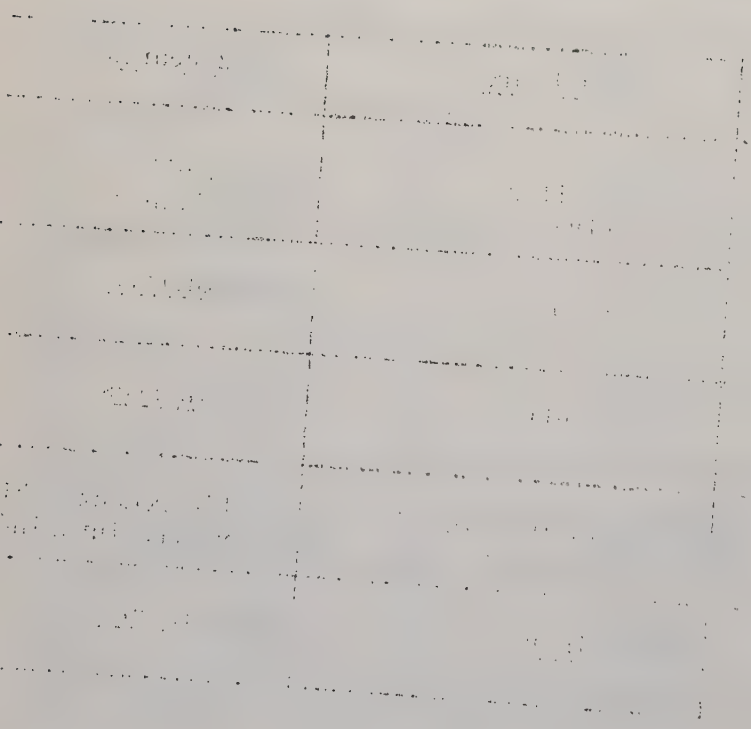
TABLEAU VIII

ACTION DE LA FRACTION ALCOOLO-ACETONO-SOLUBLE SUR HYMENOLEPIS NANA

Concentration	1 heure	2 heures
Témoins	mobiles vivants	mobiles vivants
0,33 p. 100	mobiles	inertes
0,5 p. 100	mobiles	inertes
1 p. 100	légèrement mobiles contractés	légèrement mobiles rostre invaginé
2 p. 100	inertes	inertes

- Action sur Hymenolepis nana insérés sur iléon

On réalise cet essai avec la fraction alcoolo-acétono soluble dont la concentration est de 20 mg par ml soit 2 p. 100. Après deux heures de contact, les ténias apparaissent inertes et fixés, les témoins étant



mobiles et détachés. Le lavage effectué 3 heures après le début de l'expérience ne modifie pas l'aspect des vers.

- c) essais sur l'animal

- Essais sur la souris :

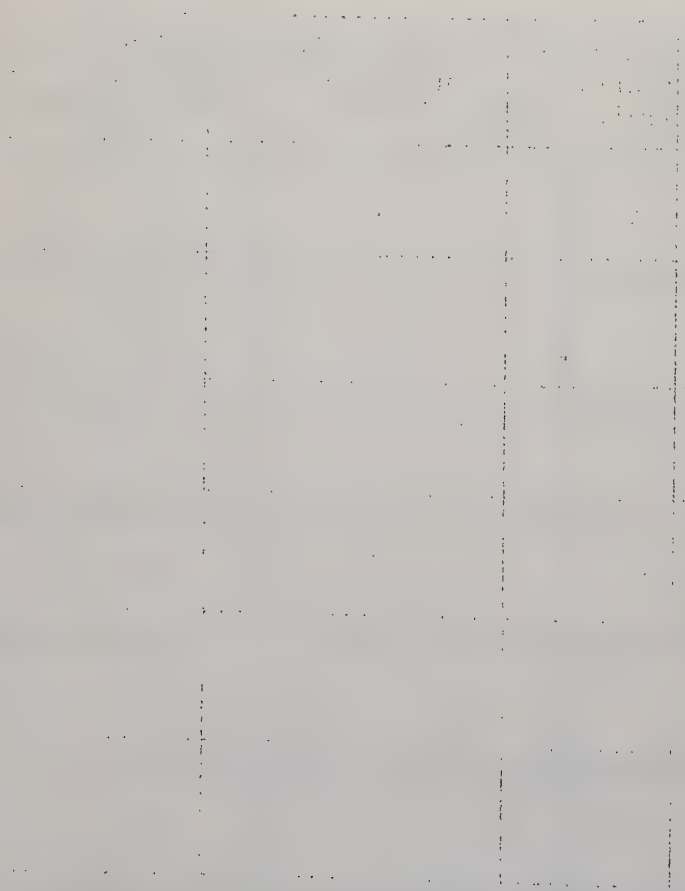
On suit la technique de CAVIER légèrement modifiée et précédemment exposée. Les souris sont réparties en lots, traités par différentes doses du produit mis en solution dans l'huile de courge. Les souris témoins au nombre de 5 reçoivent 0,5 ml d'huile de courge.

Les résultats sont résumés dans le tableau IX

TABLEAU IX

ACTION DE LA FRACTION ALCOOLO-ACETONO-SOLUBLE CHEZ LA SOURIS

Dose par souris en mg	Dose par kilo	Nombre de souris traitées	Résultats de l'autopsie	
			Souris déparasitées	Souris parasitées
Témoins		5	1	4
0,53	26,5 mg	4	2	2
1,32	66 mg	5	4	1
2,65	132,5 mg	4	1	3
5,3	265 mg	5	3	2
500	25 g	5	4	1



- Essais chez le chien

La fraction alcoolo-acétono-soluble a été administrée à des chiens soit sous forme de pilule dont la formule est la suivante :

extrait alcoolo-acétono-soluble..... 100 mg
réglisse pulvérisée..... 150 mg
extrait d'aubépine..... 200 mg
gomme pulvérisée..... 20 mg

pour 1 pilule

soit sous forme de capsule dosée à 1 g. du principe actif. 1h30 après la prise du médicament, on administre au chien 30 g. d'huile de ricin.

Les résultats sont résumés dans le tableau X

TABLEAU X

ACTION TENIFUGE DE LA FRACTION ALCOOLO-ACETONO-SOLUBLE CHEZ LE CHIEN

Dose en mg par kilo	Référence	Poids	Traitement	Observation	Résultats
20 mg	Teckel 8 mois	5 kgs	1 pilule	Pas d'expulsion observée Pas de réapparition d'anneaux après 4 mois	+
25 mg	Fox terrier	4 kgs	1 pilule	Réapparition des anneaux 15 jours plus tard	-
100 mg	Berger allemand 3 mois $\frac{1}{2}$	10 kgs	1 pilule	Vomissements biliaires, Expulsion d'un grand fragment de ténia, Réapparition des anneaux 15 jours plus tard	+ -

- d) Essais cliniques :

Nous avons donné cette fraction à 2 malades :

- Madame B. 50 kgs parasitée par Toenia saginata absorbe 4 capsules dosées à 1 g. (soit 80 mgs par kg.) Une heure trente après la fin du traitement, la malade prend une limonade purgative. Elle ne constate aucune expulsion de segments mais dès le lendemain, leur élimination recommence.

- Guadeloupéen - 68 kgs parasité par Toenia saginata. L'administration du produit se fait sous forme de poudre : la fraction alcoolo-acétono-soluble, à la dose de 2 g. (soit 30 mgs par kg) est mélangée à une farine de blé destinée à l'alimentation du nourrisson, additionnée de sucre et aromatisée par de l'anis. Une heure trente après la fin du traitement, le patient prend une purgation de 30 g. d'huile de ricin. L'expulsion des segments n'est pas interrompue.

Conclusions

Les résultats observés ne sont pas très significatifs. Cela tient essentiellement aux conditions différentes dans lesquelles nous nous sommes placés pour effectuer nos essais :

- les quantités administrées sont très variables ;
- l'huile de courge qui sert à solubiliser la fraction à étudier peut influencer favorablement les résultats ;
- la morphologie et la biologie des Hymenolepis et des Toenia sont très différentes ;
- le comportement digestif des hôtes différent également.

Cependant, malgré ces réserves, l'activité de cette fraction, si elle existe, est certainement très réduite.

3 - Etude de la fraction alcoolo-soluble - acétono-insoluble

- a) caractères : Cette fraction se présente sous forme d'une masse brune, soluble dans l'eau et l'alcool, insoluble dans l'éther, l'éther de pétrole et l'acétone. Placée dans un dessicateur phosphorique, sous vide, elle perd 12,6 p. 100 de son poids et devient pulvérulente. Mais elle se réhydrate immédiatement à l'air. Elle est donc très hygroscopique.

- b) essais in vitro

- action sur Hymenolepis nana : Les ténias, mis au contact d'une solution à 2 p. 100 de cette fraction dans le soluté de Ringer (pH = 6,8), sont plus mobiles que les témoins. Le lavage effectué 6 heures après le début de l'expérience ne change pas l'état des Hymenolepis nana.

- action sur Hymenolepis nana insérés sur iléon : Avec une solution à 2 p. 100 dans le soluté de Ringer, les ténias sont mobiles et détachés comme le sont les témoins.

- c) essais sur l'animal

- action chez la souris : Nous réalisons deux séries d'expériences, en suivant la technique de CAVIER légèrement modifiée, chacune portant sur 5 animaux parasités. Nous administrons d'une part 100 mg par souris (soit 5 g. par kilo d'animal) d'autre part 250 mg (soit 12,5 g. par kilo). Ces deux doses se révèlent inactives, l'autopsie confirmant la présence de nombreux ténias.

- action chez le chien : L'administration de la fraction alcoolo-soluble acétono-insoluble se fait sous forme de pilules dont la formule est la suivante :

Fraction hydratée (12,6 p. 100 d'eau)..... 175 mg
Réglisse pulvérisée..... 130 mg
Gomme pulvérisée..... 10 mg

pour 1 pilule

Les résultats sont résumés dans le tableau XI

- d) essais cliniques : Guadeloupéen de 68 kgs parasité par Toenia saginata et précédemment traité sans résultat avec la fraction alcoolo-acétono-soluble. Il absorbe une poudre renfermant 4 g. de la fraction alcoolo-soluble-acétono-insoluble, soit 60 mgs par kg. 1 heure 30 après la fin du traitement, il prend 30 g. d'huile de ricin. L'expulsion du ver se produit en trois fois.

- Madame R. 67 kgs parasitée par Toenia saginata prend une poudre dosée à 5 g. La purgation est un mélange de résine de scammonée 2,10 g. et excipient liquoreux 100 g. La malade expulse 3 mètres d'anneaux mais quelques jours après l'émission des segments recommence.

TABLEAU XI

ACTION DE LA FRACTION ALCOOLO-SOLUBLE - ACETONO-INSOLUBLE CHEZ LE CHIEN

Doses en mg par Kilo	Références	Poids	Observations	Résultats
17	berger allemand	40 kgs	expulsion 6 heures après l'absorption du purgatif	+
26	Setter irlandais male de 20 ans	20 kgs	expulsion du ténia	+
29	épagneul male	12 kgs	pas d'expulsion mais pas de réapparition d'anneaux	+
35	caniche	15 kgs	émission abondante de ténias	+
79	épagneul femelle	11 kgs	pas d'expulsion mais pas de réapparition d'anneaux	+

Conclusions

Cette fraction semble supporter une grande activité. Cette hypothèse est confirmée par BADRE dont les travaux ont abouti à la mise au point d'une forme pharmaceutique dont l'analyse sommaire que nous avons effectuée, montre qu'elle est essentiellement constituée par cette substance.

4 - Etude de l'action des deux fractions associées

L'activité ténifuge de la fraction alcoolo-soluble-acétono-insoluble

pouvant être éventuellement augmentée par association avec la fraction acétono-soluble, nous avons fait une nouvelle série d'essais sur l'animal et chez l'homme.

- a) Essais sur l'animal :

- A un boxer de 20 kgs, on administre deux pilules correspondant à la formule suivante :

fraction alcoolo-acétono-soluble..... 25 mg
fraction alcoolo-soluble-acétono-insoluble..... 15 mg
gomme arabique pulvérisée..... 60 mg
extrait d'aubépine..... 30 mg
pour 1 pilule

2h 30 après la fin du traitement, on donne à l'animal 30 g. d'huile de ricin. Des vomissements se produisent 4 heures après la purgation. Les segments recommencent à être éliminés 3 semaines plus tard.

- Sous forme d'émulsion dans de l'eau, on donne 0,30 g de chaque fraction à un chat. N'ayant pas administré de purgation, le produit provoque une constipation durant deux jours puis une expulsion liquide. Ce traitement permet la guérison de l'animal.

- b) Essais cliniques :

- Mademoiselle M. 27 kgs

L'enfant prend une farine de blé sucré contenant 1,25 g. de la fraction alcoolo-acétono-soluble associés à 2 g. de la fraction alcoolo-soluble-acétono-insoluble, soit respectivement 46 et 74 mg par kg. La purge de 15 g. d'huile de ricin a été donnée 2 heures après la fin du traitement. L'expulsion des anneaux ne s'interrompt pas. Il est à noter que la purge a eu un effet très lent, 6 heures seulement après sont administration.

- Madame A. 60 kgs parasitée par Toenia saginata prend les deux fractions séparées et sous des formes pharmaceutiques différentes. La fraction acétono-soluble est répartie dans des capsules dosées à 1 g., la malade prenant 3 capsules par jour (150 mg en 3 jours). La fraction acétono-insoluble est incorporée à un sirop réparti en 3 jours et dont la formule est la suivante :

fraction alcoolo-soluble acétono-insoluble.... 13 g. (200 mg/kg en 3 jou
sucre..... 60 g.
extrait d'écorces d'oranges amères..... 15 g.
eau..... qsp 90 ml

Ce traitement n'est pas suivi de purgation. L'expulsion des segments ne s'interrompt pas.

- Monsieur D. 60 kgs parasité par Toenia saginata prend une poudre renfermant 3,50 g de la fraction acétono-soluble (soit 60 mg/kg)associés à 4 g. de la fraction acétono-insoluble (soit 66 mg/kg). 2 heures après la fin du traitement, il prend une purge de 15 g d'eau de vie allemande. Il y a expulsion de quelques segments, mais rechute 1 mois plus tard. Il faut constater que la purge a eu un effet très lent.

CONCLUSIONS GENERALES

Une revue bibliographique montre les incertitudes qui caractérisent nos connaissances actuelles sur l'activité ténifuge des courges bien que leur emploi soit très ancien.

Une étude expérimentale complétée par quelques essais cliniques a permis d'apporter une solution à un certain nombre de problèmes.

L'expérimentation s'appuie sur l'évaluation de l'activité anthelminthique par des techniques originales utilisant Dicrocoelium dendriticum et Hymenolepis nana. Elles ont été substituées à celles utilisées par de nombreux auteurs qui font appel à des réactifs biologiques non spécifiques (ver de terre, ascaris, oxyure...).

Les résultats acquis peuvent être résumés comme suit :

1° - 100 grammes de semences sèches de citrouilles ou de giraumonts provenant de fruits cultivés en France, suffisent pour l'expulsion du Toenia saginata.

2° - Le principe actif est essentiellement localisé dans le tegmen ; il se trouve à une concentration moindre dans l'amande ; le testa et la pulpe du fruit en sont pratiquement dépourvus.

3° - L'huile purifiée, qui représente 438 p. 1000 du poids des semences décortiquées, est inactive.

4° - L'activité ténifuge semble être liée à deux fractions :

- L'une, de consistance huileuse et de coloration verte est soluble dans l'éther, l'acétone et partiellement soluble dans l'alcool à 95° ; elle précipite par l'éther de pétrole.

- l'autre, pulvérulente à l'état anhydre, est très hygroscopique et forme une masse brune ayant la consistance d'un extrait mou. Elle est soluble dans l'eau, l'alcool à 95 mais est insoluble dans l'éther, l'éther de pétrole et l'acétone.

BIBLIOGRAPHIE

1. BADRE Y. - Recherches sur la composition chimique des graines de courge et sur leur activité ténifuge.
Thèse doct. Pharm. Faculté française de Médecine et de Pharmacie de Beyrouth, 19 Juin 1958.

2. BRUNET J. - Communication de plusieurs observations sur l'efficacité de la pâte de semences de courge contre le ténia.
Journ. Med. Bordeaux 1846, 122 et 411.

3. CARBLOM G. - Uber den Wirksamen Bestandtheil des ätherischen Farrenkrautextrakes.
Diss Dorpat 1866.

4. CAVIER R. - Sur une nouvelle technique pharmacologique d'essai des ténifuges.
Ann. Pharm. Française 1956, 14, (7-8), 545-552.

5. CAZIN P. - Gaz des Hôpitaux civils et militaires. 1858, 31, 539.

6. COLORADO IRIS R., TREVINO A., DOMINGUEZ R., et MAZZOTI L. - La semilla de Calabaza en el tratamienta de las teniasis.
Rev. inst. salub. y enferm. trop. Mexico. 1950, 11, 57-59.

7. DUMAS A. - Journ. Ther. de Paris 1865, 18, 374.

8. ERHARDT A. - Die chemotherapeutische Prüfung von Wurmmitteln.
Die pharmazie 1948, 3, 49-58.

9. FREISE F.W. - Pharm. zentralhalle 1938, 79, 97.

10. GIRARD B. - Bull. gen. de ther. Paris 1862.

11. HECKEL E.- Mémoire sur la localisation du principe actif de la semence de courge.
C.R. Ac. Sc. 16 Août 1875.

12. KING J. - The américan dispensatory, Cicinnati 1864.

13. KORILOW P., DORNER A. et WOLKOWITSCH M. - Ann. de Therap 1862, 176.

14. KORILOW P. - Pharm. Zeitsch of Russland 1876, 15, 513.

15. KRAYER P. - Kürbissamen als Bandwurmmittel.
Klin. Wschz 1937, 16, 1651-1652.

16. LASSERRE J. - Nouvel exemple de toenia expulsé par les semences de citrouille.
Journ. Med. de Bordeaux, 1861, 2ème semaine, 6ème année, 313-314.

17. LENDLE A. - Arch. der Pharmazie 1937, 276, 45-53.

18. MAZZOTI L. et TREVINO A. - La semence de courge dans le traitement du ténia.
Sem. des Hôp. 1951, 27,3180-3184.

19. MERAT F.V. et de LENS A.J. - Dictionnaire universel de matière médicale
Paris 1830, 2, 493.

20. MINNER A. - Amer. Journ. of Pharm. 1890, 62, 274.

21. MONGENY D. - Sur un nouveau Vermifuge.
Journ. univ. des Sc. med. 1820, 19, 125-126.

22. NEELY J.S. et DAVY E.D. - The anthelmintic proprieties of Cucurbita pepo.
Journ. of Amer. Pharm. Assoc. 1931, 20, 555-558.

23. PERROT E. - Matière première du règne végétal 2055-2057.

24. PFISTER A. - Pharm Ztg 1935, 80, 394.

25. POWER F.B. et SALWAY A.H. - Farm. Ofic. Espa. Ed 7 Madrid 1907

26. RATH E. - Kurbiskerne als Wurmmittel
Arch. für exp. Path. u. Pharmakol 1929, 142, 157-161

27. REBELLO S., GOMES da COSTA S.F. et TOSCANORICO J. - La réactivité des Helminthes étudiée par la méthode graphique
C.R. Soc. Biol. 1926, 94, 918-933.

28. REBELLO S., GOMES da COSTA S.F. et TOSCANO RICO J. - Sur l'emploi des Cestodes humains (Toenia saginata) comme réactif pharmacologique pour l'étude des anthelminthiques.
C.R. Soc. Biol. 1933, 113, 509-510.

29. RULLE V. - Diss Dorpat 1867.

30. SCHNEIDER A. - The earthworm method for testing Santonin and related anthelmintics.
Journ. Amer. Pharm. Assoc. 1927, 16, 623-627.

31. SCHROEDER W. - Uber das Pelletierim.
Arch. für exp. Path. u. Pharmakol. 1884, 18, 381-400.

32. SCHROEDER W. - Uber die Wirkung einiger fifte auf Askariden.
Arch. für exp. Path. u. Pharmakol 1885, 19, 290-309.

33. SCHUBIGER A.E. - Uber semen Cucurbitae.
Inaug Diss Bern Juillet 1940.

34. SEELKOPF K. - Arzneimittel Forschg 1952, 2, 55.

35. SEELKOPF K. et GRAAF E. - Arzneimittel Forschg 1952, 2, 352.

36. SLOP C. - Jahresbericht der Pharmacie 1881, 41-42, 202.

37. SOLLMANN T. - Anthelmintics : Their efficiency as tested on earthworms
Journ. of Pharmakol a exp. Therap 1919, 12, 129-170.

38. SOULE R. - The Boston Med and Surg. Journ. 1851, 45, 201.

39. STRAUB W. - Pharmakologische Studien über die Substanzen der Filixsaüre gruppe.
Arch. für exp. Path. u. Pharmakol 1902, 48, 1-47.

40. TARNEAU J.L. - Du ténia en Algérie et de son endemicité dans la ville de Bône.
Gaz. med. de l'Algérie 1860, 5, 44-47.

41. TARNEAU J.L. - Gaz des Hôpitaux de Paris 1863, 394.

42. TRENDELENBURG P. Arch. exp Path. u. Pharmakol. 1916, 79, 190.

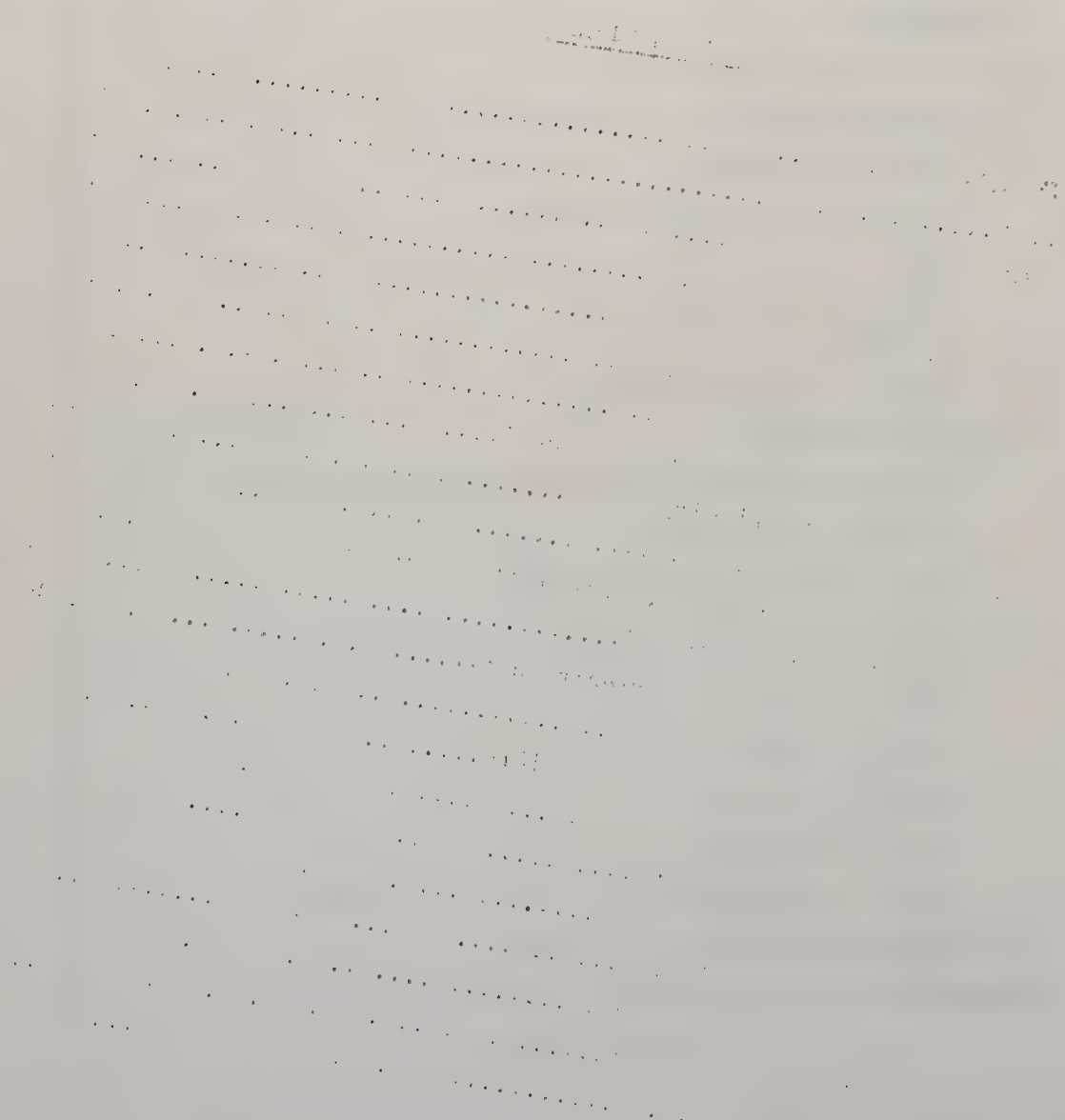
43. VALENTIN J.-BROCKELT G. - Semen cucurbitae als Bandwurmmittel.
Die Pharmazie 1954, 11, 412-416.

44. VEEN A.G. - COLLIER W.A. - Stable palatable préparation of Cucurbito moschata. Dutch 1949, 63, 333.

45. VIGIER E. - L'union pharmaceutique. Juin 1876.

46. WARDFERRILI H., CHAPELHILL Ph. D. - A simplified méthod for feeding Ra
Journ. of Labatory a. Clinical Medicine 1942, 28, 1624-1625.

47. WOLFF. - Proceeding of the Pensylvania
Pharmaceutical association 1882, 5, 145.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION..... 1
PLAN..... 3
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... 7
Espèces ténifuges..... 8
Provenance géographique..... 9
Etat des graines..... 10
Critères d'activité..... 10
Localisation du principe actif..... 15
Nature du principe actif..... 19
ETUDE EXPERIMENTALE..... 25
Espèces ténifuges, provenance, état des graines..... 27
Critères d'activité..... 29
Localisation du principe actif..... 36
Etude de la pulpe..... 36
Etude de la semence entière..... 39
Etude du testa..... 40
Etude du tegmen..... 42
Etude de l'amande..... 43
Etude de l'huile..... 44
Etude du tourteau..... 47
CONCLUSIONS GENERALES..... 59
BIBLIOGRAPHIE..... 61